

博士論文

マウスにおける食事誘導性体重変化時の
脂肪肝感知へパトカイン **LECT2** の急速な反応

金沢大学大学院自然科学研究科自然システム学専攻

学籍番号 1424062005

氏名 近本 啓太

主任指導教員名 松郷 誠一

提出年月 2017 年 1 月 5 日

目次

第一章背景.....	1
1-1 肥満.....	1
1-2 糖尿病	2
1-3 肥満時におけるアディポカインの異常分泌とインスリン抵抗性	3
1-4 肝臓由来分泌タンパクヘパトカイン	4
1-5 肥満関連ヘパトカイン LECT2.....	4
1-6 LECT2 発現制御.....	6
1-7 ダイエットとリバウンド	8
第二章 実験試薬及び装置	10
2-1 動物実験マウス	10
2-2 肝臓中性脂肪含有量測定	11
2-3 total RNA 抽出	11
2-4 cDNA への逆転写反応.....	12
2-5 Real-time PCR による検出	12
2-5 マウス血中 LECT2 濃度測定.....	13
2-6 血中インスリン濃度測定	14
2-7 血中グルコース濃度測定	14
2-8 脂肪細胞直径測定.....	14
2-9 マウス初代培養肝細胞.....	15
2-10 ラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 培養.....	16
2-11 statistical analysis	16
第三章 急激な栄養変化時の体重および血中 LECT2 濃度変化の検討.....	17
3-1 序章.....	17
3-2 実験方法.....	18
3-3 結果.....	19

3-3-1 リバウンドモデルマウスの作成.....	19
3-3-2 実験中のマウス摂食量.....	21
3-3-3 食種変更時の体重及び血中 LECT2 濃度変化	22
3-4 考察.....	25
第四章 リバウンドによる各組織での影響.....	27
4-1 序章.....	27
4-2 実験方法	27
4-3 結果.....	28
4-3-1 リバウンドが LECT2 産生に及ぼす影響	28
4-3-2 リバウンドが血中インスリン濃度および血中グルコース濃度に与える影響	30
4-3-3 リバウンドが脂肪肝に与える影響	31
4-4-4 リバウンドが脂肪組織に与える影響.....	35
4-4 考察.....	40
第五章 血中 LECT2 濃度と肥満関連パラメータとの相関関係	42
5-1 序章.....	42
5-2 実験方法.....	42
5-3 結果.....	42
第六章 LECT2 過剰産生誘導因子の探索	45
6-1 序章.....	45
6-2 実験方法.....	46
6-2-1 インスリンによる LECT2 転写活性の制御.....	46
6-2-2 マウス初代培養肝細胞を用いたインスリンによる <i>Lect2</i> 遺伝子発現制御の検 討.....	47
6-3 結果.....	48
6-3-1 インスリンによる LECT2 転写活性の制御.....	48

6-3-2 マウス初代培養肝細胞を用いたインスリンによる <i>Lect2</i> 遺伝子発現制御の検 討.....	49
6-4 考察.....	50
第七章 総括	51
謝辞.....	53
参考文献	54

第一章背景

1-1 肥満

時代とともに我々の身の回りの環境は大きく変化してきた。現在、町を歩けば多くの飲食店が建ち並び、常に身近に高カロリーの食事が蔓延している。さらに、仕事も肉体労働中心からデスクワーク中心に切り替わり、日々の運動不足が問題視されている。このような、過剰な高カロリー食の摂取や、運動不足によって引き起こされる肥満が世界的な問題となっている。肥満は、生体内で脂肪が過剰に蓄積された状態と定義され、日本では体重を身長²の二乗で割った

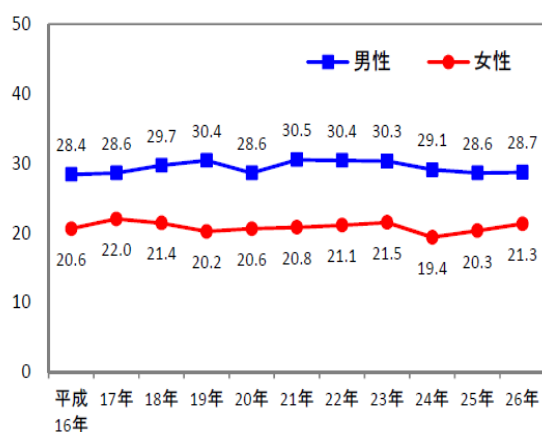


Fig 1.1 肥満者の割合の年次推移(20 歳以上)

厚生労働省 平成 26 年国民保健・栄養調査より引用

body mass index(BMI)が 25 以上を肥満と定義している。厚生労働省平成 26 年国民保健・栄養調査¹によると日本における肥満者数は 10 年間ではほぼその数に変化はない。しかしながら、平成 26 年次には男性においては 28.7%、女性においては 21.3%の人が BMI25 以上の肥満となっており、日本においても 4 人に 1 人が肥満とされている (Fig 1.1)。また、世界的に見ると日本の肥満者数は非常に少ない。世界保健機関 (WHO)では BMI が 25 以上を過体重、30 以上を肥満と定義している。世界

における肥満者数は、特にアメリカやメキシコに多く人口の 30%以上の人が BMI30 以上の肥満である。現在、スナック菓子やソーダに課税をかけるなど、世界中で肥満に対する対策がとられており、肥満の解消は世界的な課題となっている。

肥満は、様々な疾患の原因として知られており、特に 2 型糖尿病²や、高血圧³、脂質異常症⁴などの生活習慣病と深い関わりを持っている。2016 年には、239 件の研究を基に肥満と死亡率の関連がメタ解析で検証されている⁵。この調査では、基礎疾患のない非喫煙者を対象としており、調査の結果、BMI が 20-25 の正常な人と比較して、BMI が 5 増える毎に死亡率が約 30%上昇しており、肥満による寿命の低下が報告された。肥満は生体にとって悪影響であり、肥満状態であることは非常にハイリスクな状態であるといえる。

1-2 糖尿病

インスリンは膵臓のランゲルハンス島にある β 細胞で産生されるペプチドホルモンである。インスリンは食事による血糖値の上昇を素早く感知し、即座に膵臓から分泌され、血糖値を低下させる作用を有する。インスリンは、主に、骨格筋、脂肪組織、肝臓において作用する。インスリンは骨格筋においては、インスリン受容体と結合し V-akt murine thymoma viral oncogene homolog (Akt)を介して糖輸送体である Glucose transporter type 4 (GLUT4)の膜移動を促進させ、糖取り込みを促進する。またこのとき、全体の糖の 70%以上が骨格筋で取り込まれている⁶。インスリンは肝臓においては、転写因子 Forkhead box protein O1 (FoxO1)の不活性化を介して糖新生を抑制し、グリコーゲンの合成を促進する。インスリンは血糖値を低下させる唯一のホルモンであり、それ故に、インスリンの分泌低下、インスリンの作用低下は血糖コントロール不全を引き起こし、糖尿病の原因となる。

糖尿病は、血糖コントロールができず血糖値が高い状態を維持する代謝性疾患である。日本においても糖尿病患者数は多く、平成 26 年国民保健・栄養調査

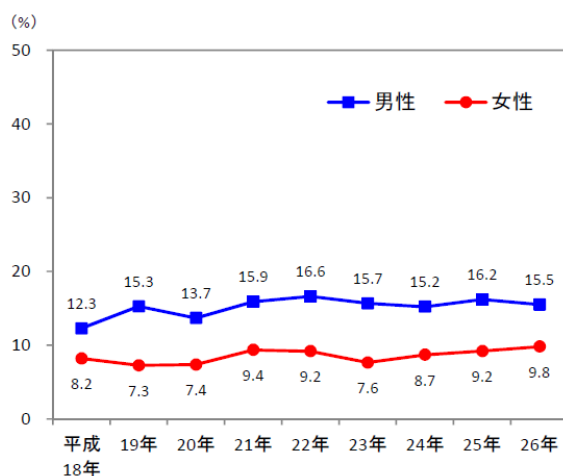


Fig 1.2 「糖尿病が強く疑われる者」の割合の年次推移(20 歳以上)

厚生労働省 平成 26 年国民保健・栄養調査より引用

では「糖尿病が強く疑われる者」の割合が、男性で 15.5 %、女性で 9.8 %であり、非常に身近な代謝疾患である。糖尿病はその発症の原因から 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に分類される。1 型糖尿病は、インスリンを分泌する膵臓の β 細胞が減少することで、インスリン分泌が出来なくなり高血糖を示す疾患である。対して 2 型糖尿病は、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌の障害と、インスリン標的臓器でのインスリン受容体以降の情報伝達の障害であるインスリン抵抗性を原因として高血糖を示す疾患である。糖尿病患者の多くは 2 型糖尿病

である。糖尿病が危険な疾患とされているのは様々な合併症を引き起こすことにある。糖尿病は糖尿病網膜症や糖尿病腎症、糖尿病性神経障害など様々な合併症を引き起こし、失明や腎不全、壊疽などをもたらす。それ故に糖尿病患者における血糖コントロールの改善は非常に重要である。

1-3 肥満時におけるアディポカインの異常分泌とインスリン抵抗性

肥満と2型糖尿病は密接に関わっていることが知られている^{2,7}。動物モデルでもヒトでも、全身の糖取り込みの低下（インスリン抵抗性）と内臓脂肪の蓄積（内臓肥満）は同時に見られることが多い⁸。これまでにインスリン抵抗性惹起のメカニズムは多く報告されている。脂肪組織においては、肥満者では肥大化した脂肪細胞から腫瘍壊死因子 Tumor necrosis factor ($\text{TNF}\alpha$)、Retinol binding protein 4 (RBP-4)や Free fatty acid (FFA)の放出が高まり、全身のインスリン標的臓器においてインスリン抵抗性が誘導されと考えられている^{9,10,11}。また、脂肪組織から分泌されるアディポネクチンは善玉ホルモンとして知られている。アディポネクチンは肝臓や骨格筋に作用し、AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化を介して、糖取り込みや脂質代謝を亢進させインスリン抵抗性を改善する作用を有する¹²。さらにアディポネクチンは、肥満時にその血中濃度が低下する¹³。肥満におけるインスリン抵抗性の惹起には、インスリン抵抗性を惹起する悪玉アディポカインの過剰な分泌およびインスリン抵抗性を改善する善玉アディポカインの分泌低下が起こっている(Fig 1.3)¹⁴。

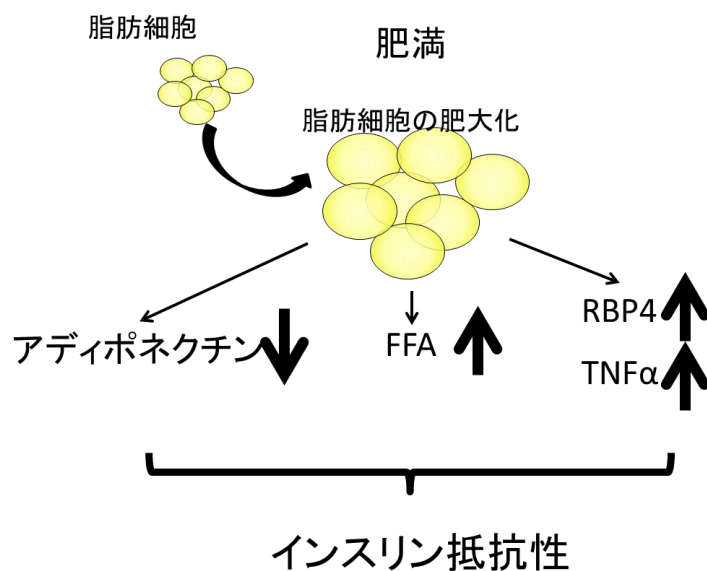


Fig 1.3 肥満時におけるアディポカイン分泌異常とインスリン抵抗性惹起メカニズム

1-4 肝臓由来分泌タンパクヘパトカイン

肝臓は体重の約 1/50 の重量をもつ生体内最大の臓器である。肝臓は、糖、脂肪、タンパク質の代謝や有害物質の解毒、胆汁酸の合成など様々な機能を有している臓器である。また、飢餓時には肝臓は糖新生を行い、グルコースを血液中へ放出し、低血糖から生体を保護している。肝臓はインスリンの標的臓器であり、インスリンは肝臓において糖新生を抑制する。さらに、肝臓は生体内最大の脂質合成器官であり、インスリンは肝臓における内因性脂質合成を亢進する¹⁵。肝臓におけるインスリン抵抗性は、糖新生を亢進し、代償性高インスリン血症を引き起こす。さらにはこの高インスリン血症により肝臓における脂質合成が亢進し、全身の脂質代謝異常が生じる。このように肝臓でのインスリン抵抗性は全身の糖・脂質代謝に多大な悪影響を及ぼすと考えられ、肥満や 2 型糖尿病の病態を形成する要素の一つとして重要である。

肝臓は多くの分泌タンパクを産生する臓器としても知られる。肝臓から分泌され生体内で様々な作用を引き起こす分泌タンパクはヘパトカインと呼ばれ、代謝疾患に大きく関わっている。我々の研究室ではヘパトカインの一つである Selenoprotein P を同定し、Selenoprotein P は 2 型糖尿病患者で産生が増強され、肝臓や骨格筋に作用しインスリン抵抗性を引き起こすことを報告した¹⁶。さらにその後の研究において、selenoprotein P が血管新生を促進する vascular endothelial growth factor (VEGF) の作用を低下させる VEGF 抵抗性を誘導することで、血管新生を低下させ、糖尿病性壊疽の病態を形成していることを報告した¹⁷。このように、ヘパトカインは代謝疾患の惹起において非常に重要な役割を担っている¹⁸。

1-5 肥満関連ヘパトカイン LECT2

leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) は、1996 年に好中球走化性分子として初めてクローニングされ、151 個のアミノ酸をコードし N 末端に 18 個のシグナルペプチドを有する約 16 kDa の分泌タンパクである^{19,20}。ノーザンブロット法による検出では LECT2 は精巣においてもわずかに発現がみられるが、ほぼ肝臓特異的に発現している²⁰。さらに免疫染色の結果から、LECT2 は肝実質細胞で発現することが示された²¹。LECT2 は様々な生理作用を有することが知られている。LECT2 は腎アミロイドーシスに関わるアミロイドタンパクとして報告された²²。LECT2 は発生に関わる Wnt/ β カテニン負に制御していることが報告された²³。また、LECT2 は、肝がんを抑制すること²⁴、さらに LECT2 はマクロ

ファージの dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)を介して敗血症を抑制すること²⁵や、hepatocyte growth factor (HGF)の受容体であるc-METのシグナル伝達を不活化させることで肝細胞癌進行を防ぐこと²⁶が報告されている。

我々の研究室では、2014年にLECT2が肥満時に認められる骨格筋インスリン抵抗性惹起において重要な因子であることを報告した²⁷。この論文において、ヒト肝臓の網羅的な遺伝子解析の結果から²⁸、肝遺伝子発現量とBMIが正相関するヘパトカインとしてLECT2が同定された²⁷。ヒト血中LECT2濃度はBMIや腹囲などの肥満パラメータと正相関しており、LECT2が肥満状態においてその産生が増加するヘパトカインであることが示された。LECT2ノックアウトマウスやC2C12筋管細胞を用いた実験から、LECT2はc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化を介して骨格筋特異的にインスリン抵抗性を引き起こすヘパトカインであることが見出された²⁷。

先の論文において、マウスを用いた実験では、血中LECT2濃度は絶食時と比較して食後に上昇した。加えて、3時間の運動は血中LECT2濃度を減少させた。これらの結果は、全身のエネルギー状態が増加したときにLECT2の産生が上昇することを示唆する。その機序として、培養肝細胞を用いた実験から、LECT2の遺伝子発現はAMPKによって負に制御されることを明らかにした。恒常活性型のAMPKをコードするアデノウイルスベクターを培養肝細胞に感染させるこ

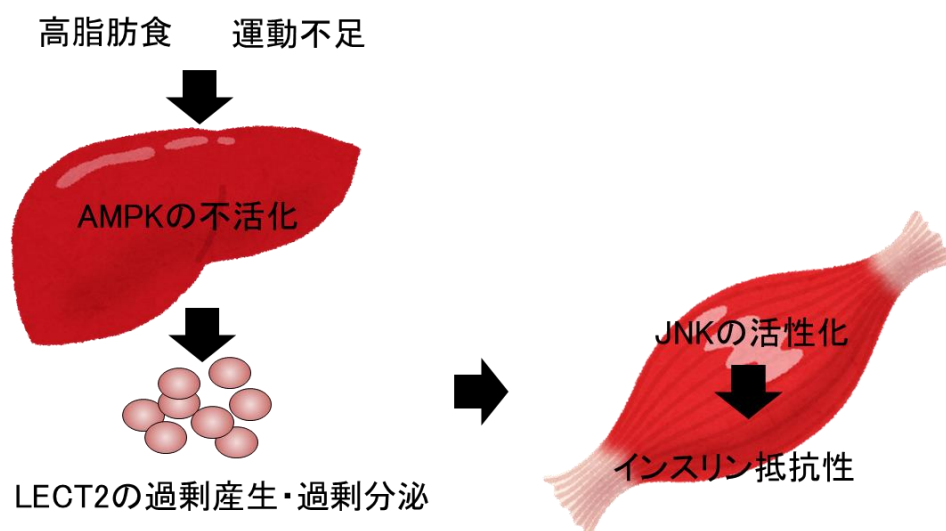


Fig 1.4 肥満時における LECT2 の過剰産生と LECT2 の骨格筋特異的インスリン抵抗性惹起メカニズム (Lan F *et al. diabetes* 2014) 改訂

とで *Lect2* 遺伝子発現は抑制され、不活性型の AMPK をコードするアデノウイルスベクターを細胞に感染させると *Lect2* 遺伝子発現は上昇した。この結果は、培養肝細胞での *Lect2* 遺伝子発現は AMPK によって抑制されることを示す。AMPK は生体内でエネルギー飢餓に対するセンサーとして働くキナーゼである。AMPK は飢餓や運動時に増加する細胞内の AMP によって活性化され、活性化した AMPK は脂肪合成や糖新生を抑制し、糖取り込みや脂質代謝を促進しエネルギー産生を促進する^{29,30}。さらに、AMPK アクチベーターであるメトホルミンは AMPK の活性化を介して selenoprotein P の発現を抑制することが報告されている³¹。一方で、肥満や脂肪肝ではエネルギーの過剰によって AMPK が不活化することが報告されている³²。これらの結果から、肥満状態ではエネルギーの過剰によって肝臓での AMPK 活性が抑制される結果、肝臓からの LECT2 の過剰産生・過剰分泌が生じ、この LECT2 が骨格筋で JNK を活性化することで筋インスリン抵抗性が惹起されることが示された (Fig.1.4)。

1-6 LECT2 発現制御

LECT2 の発現制御についてこれまでに研究されている。2004 年に胚発生やがんに関わる Wnt/ β カテニンシグナルによって制御されていることが報告された³³。この論文では、 β カテニンが LECT2 プロモーターに直接結合することで LECT2 の発現を制御している。

我々の研究室ではその後、過栄養によって肝細胞の *Lect2* 遺伝子が上昇する

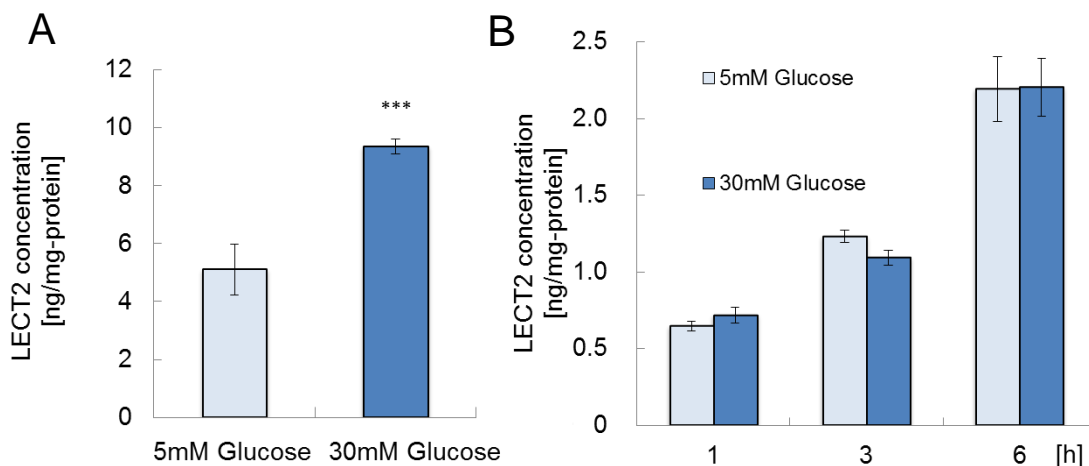


Figure 1.5. グルコース処置による LECT2 産生誘導

A: 30 mM のグルコースを 24 時間処置した際の LECT2 産生

B: 30 mM のグルコースを時間依存的に処置した際の LECT2 産生

メカニズムについてさらなる検討を進めた。これまでに、マウス肝がん由来 Hepa1-6 細胞に 5 mM グルコースと 30 mM グルコースを 24 時間処置すると、培養メディウム中の LECT2 濃度は 30 mM のグルコース処置において約 2 倍に上昇した(Fig1.5.A)。しかしながら、グルコースによる誘導は 6 時間の処置では

見られずに 24 時間の長期処置のみに見られた(Fig 1.5.B)。

さらに、Hepa1-6 細胞に様々な脂肪酸を 0.25 mM で 24 時間処置するとパルミチン酸処置時に培養メディウム中の LECT2 濃度は約 1.2 倍に上昇した(Fig 1.6)。

しかしながら、グルコースや脂肪酸処置の培養肝細胞の実験結果は、マウスの実験結果と比較すると LECT2 上昇が非常に軽微でかつその上昇が誘導されるまでに時間がかかっている。このことから、高脂肪食によって誘導される LECT2 産生上昇には、食餌中の成分以外の誘導因子が存在す

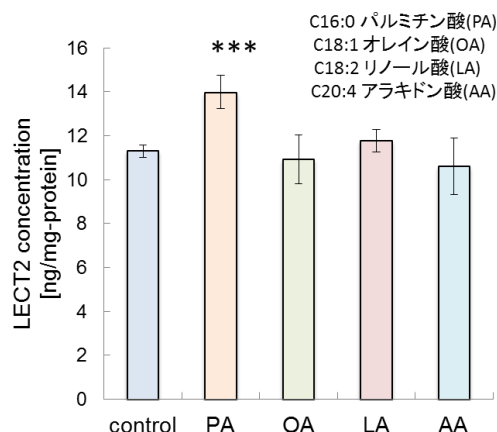


Figure 1.6.各種脂肪酸処置による LECT2 産生誘導

各脂肪酸を 0.25 mM で 24 時間処置した際の LECT2 産生

ることが考えられた。

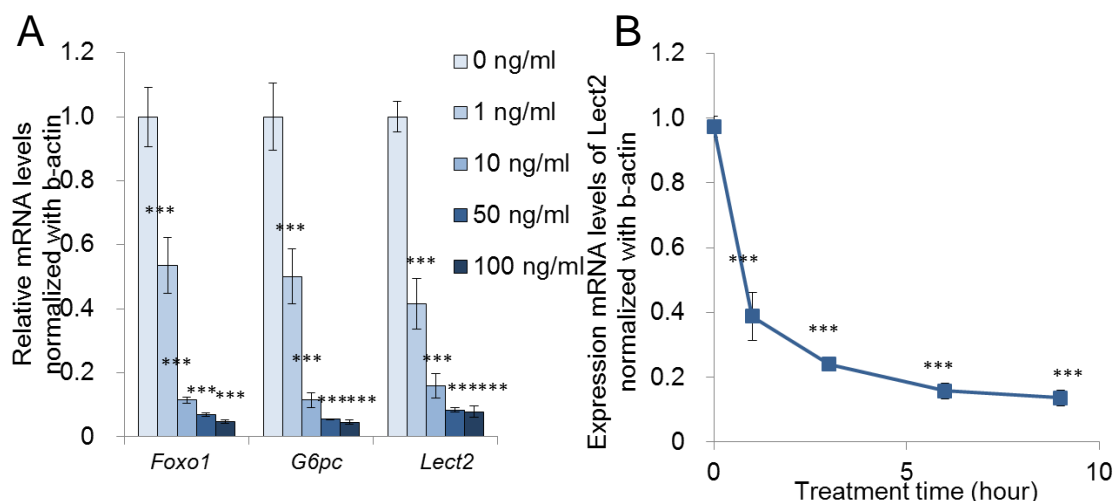


Figure 1.7.インスリン処置による LECT2 産生誘導

H4IIEC3 細胞にインスリンを処置した際の *Lect2* 遺伝子発現

A: インスリン濃度依存による *Lect2* 遺伝子発現の抑制

B: インスリン処置時間依存による *Lect2* 遺伝子発現の抑制

さらに我々の研究室では、ラット肝がん細胞 H4IIEC3 にインスリンを処置することで、*Lect2* 遺伝子発現が抑制されることを報告した(Fig 1.7)。このときインスリンによる *Lect2* 遺伝子発現抑制は低濃度のインスリンでも *Lect2* 遺伝子発現が強く抑制され、かつ 1 時間のインスリン処置でも *Lect2* 遺伝子発現は抑制された(Fig 1.7.B)。これらの結果は、*Lect2* 遺伝子発現はインスリンによって負に制御されている可能性を示唆し、肥満状態ではインスリン抵抗性の惹起がインスリンの作用不足を誘導し、その結果肥満時に LECT2 の産生が増大していることが考えられる。しかしながら、これまでにインスリンによる *Lect2* 遺伝子抑制作用の詳細なメカニズムは明らかになっておらず、さらなる検討が必要である。

1-7 ダイエットとリバウンド

肥満症や糖尿病に対する治療において、運動療法や食事療法は非常に効果的である。運動は健康増進効果をもたらす³⁴、運動療法は体重減少に効果的である³⁵。また、食事療法は 2 型糖尿病や脂肪肝に対して有益な効果をもたらすことも報告されている^{36,37}。食事療法や運動療法は体重減少を誘導するが、その後に再び体重が増加するリバウンドがたびたび起こる³⁸。マウスを対象としたリバウンドの実験では、4 回のリバウンドの繰り返しは、高脂肪食摂取マウスと比較して、体重の増加及び脂肪肝の増悪させることが報告されている³⁹。さらに単回のリバウンドは、高脂肪食摂取マウスと比較して脂肪細胞が肥大化させることが報告されている⁴⁰。その一方で、単回のリバウンドを負荷したマウスは、高脂肪食摂取マウスと比較すると、脂肪肝の程度は同等であるという報告もある⁴¹。さらに、複数回のリバウンドを繰り返したマウスでは、その死亡率が正常食摂取マウスと同等であり、高脂肪食摂取マウスと比較すると、長命であることも報告されている⁴²。ヒトを対象としたリバウンドの実験も報告されており、リバウンドの繰り返したヒトは、さらなる体重増加や脂肪細胞の肥大化を導くことや^{43,44}、インスリン抵抗性を惹起させることが報告されている⁴⁵。さらに、ヒトを対象とした大規模臨床試験ではリバウンドは 2 型糖尿病発症のリスクであると報告されている⁴⁶。一方では、ダイエットによる脂肪肝改善効果は、リバウンド後でも維持されるという報告もある⁴⁷。ダイエットとリバウンドを繰り返すことは多くの議論がなされており、リバウンドが善なのか悪なのかは未だに決着がついていない⁴⁸。

食事療法によるダイエットは体重減少の効果が見込まれる一方で、中には食事制限を行ってもすぐにその効果が出ずに、ダイエットのモチベーションが続

かずにやめてしまう人もいる。さらに、通院で食事指導を受ける場合では、食事の管理を自分自身で行う必要があり、実際にうまく食事制限が出来ているかを判断するのは難しく、体重の変化から判断するしかない。このような背景から、現在、ダイエットのモチベーションの維持や食事療法遵守度を測ることが出来る、過栄養マーカーが求められている。

現在、臨床で用いられている生体内の栄養状態を表すタンパク質として栄養アセスメント蛋白・Rapid turnover protein(RTP)が用いられている(table 1)。栄養アセスメント蛋白は、迅速に合成されるタンパク及び血中半減期の非常に短いタンパクであり、リアルタイムの動的な栄養変化を評価することが出来る。また、血中栄養アセスメント蛋白濃度の低下は、生体内のタンパクエネルギー失調を示す。プレアルブミンやレチノール結合タンパクは、術後や高齢者に対する栄養管理に用いられており、特に栄養失調など低栄養状態時の栄養評価として用いられている^{49,50,51}。しかしながら、これまでに肥満や2型糖尿病といった過栄養疾患における栄養アセスメント蛋白は報告されていない。現代の飽食の時代において、過栄養疾患の患者数が上昇している中、ダイエットの効果を反映できる生体内栄養状態を反映する過栄養マーカーは臨床において非常に有意義である。

Table 1. 栄養アセスメント蛋白

蛋白	半減期(日)	分子量(Da)	基準値
レチノール結合蛋白	0.5	21,000	2.4~7.0 mg/dl
トランスサイレチン (プレアルブミン)	1.9	54,980	22.0~40.0 mg/dl
トランスフェリン	7	76,500	190~340 mg/dl
アルブミン	21	66,000	3.9~4.9 g/dl

第二章 実験試薬及び装置

2-1 動物実験マウス

動物実験は、金沢大学動物実験規定に基づき、金沢大学動物実験委員会承認の元行った(承認番号 143206)。実験で用いたマウスは 6 週齢の雄性 C57BL/6J を三共ラボ(Tokyo,Japan)から購入した。マウスは 12 時間の明暗周期管理下で飼育し、食餌および水は自由摂取出来る環境とした。マウスの餌においては、Regular diet (RD)として CRF-1(Oriental Yeast Co.,Ltd., Tokyo, Japan)を用い(Table 2.1)、High fat diet(HFD)として 60% HFD(D12492:Research diets,Inc.,New Brunswick, NJ, USA)を使用し(Table 2.2)、3 日毎に餌を新しいものに交換した。

Table 2.1. CRF-1 成分組成.

CRF-1	/100 g
水分(g)	8.2
粗蛋白質(g)	21.9
粗脂質(g)	5.4
粗灰分(g)	6.3
粗繊維(g)	2.9
可溶性無窒素物(g)	55.3
カロリー(kcal)	357

Table 2.2. 60%High fat diet 成分組成.

60% High fat diet	/100 g
蛋白質(g)	26
炭水化物(g)	26
脂質(g)	35
その他(g)	13
カロリー(kcal)	524

2-2 肝臓中性脂肪含有量測定

凍結肝臓組織においては、その重量を測定した後、氷上で 2 ml isopropanol 中で stick homogenizer でホモジナイズした。組織懸濁液を室温で 10 分間振とうし、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を測定に用いた。肝臓中性脂肪含有量は Triglyceride E-test WAKO kit(WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて測定した。測定においては検量線を作成して行い(Fig 2.1)、測定値はそれぞれの凍結肝臓組織重量で補正した。

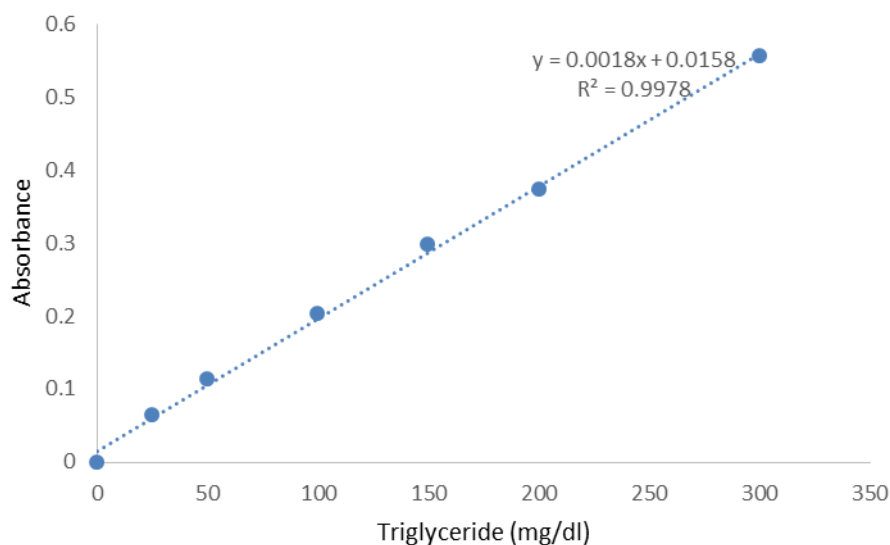


Figure 2.1.肝臓トリグリセライド含有量検量線.

2-3 total RNA 抽出

培養細胞からは High Pure RNA Kit (Roche, Basel, Switzerland)、肝臓組織からは High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて RNA 抽出を行った。また、脂肪組織からは RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) を用いて RNA 抽出を行った。RNA 濃度及び純度においては NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, Wilmington, USA) を用いて測定した。

2-4 cDNA への逆転写反応

2-3 で単離した RNA 200 ng を、Random primer (N)6, High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)を用いて cDNA 変換した。

2-5 Real-time PCR による検出

primer & probe set である TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて Real-time PCR を行った。Nuclease-free water (Ambion, Foster City, USA) 8 µL に TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10µL、及び各種 TaqMan® primer & probe set 1µL 加えた混合液を 384 well plate に 19µL ずつ添加し、さらに各 well に 2-4 で合成した cDNA サンプルを 1 µL ずつ加えた。PCR を denature 95°C 15 秒, anneal/extend 60°C 1 分で 40 cycle 行った。cDNA の増幅、検出は ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で行った。

Real-time PCR で用いる Probe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)は以下のものを使用した。

- 18SrRNA : 18SrRNA control mix
- *Fasn* : Mm00662319-m1 *fasn*
- *Srebfl* : Mm00550338-m1 *srebfl*
- *Cpt1a* : Mm01231183-m1 *cpt1a*
- *Lect2* : Mm00521920-m1 *lect2*
- *Pparg* : Mm01184322-m1 *pparg*
- *Adipoq* : Mm00456425-m1 *adipoq*
- *CD36* : Mm01135198-m1 *cd36*

2-5 マウス血中 LECT2 濃度測定

マウス血清中に含まれる LECT2 タンパクの濃度を、Ab-Match ASSEMBLY Mouse LECT2 kit (MLB International, Woburn, MA, USA) を用いて測定した。測定毎に、付属の LECT2 タンパクを用いて検量線を作成し (Fig 2.2)、20 倍希釈した血清を用いて測定した。測定波長として Measurement wavelength 450 nm, Reference wavelength 620 nm で測定した。また、本キットによる測定では、LECT2 ノックアウトマウスの血中 LECT2 濃度は検出感度以下であった (Fig 2.3)。この結果は、本 ELISA キットによって測定されている LECT2 が非特異的な反応によるものではないことを示している。

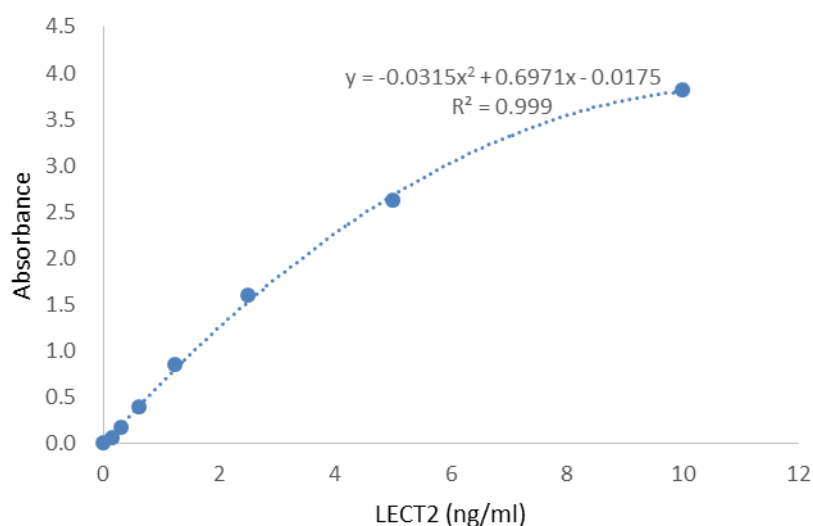


Figure 2.2 血中 LECT2 濃度検量線.

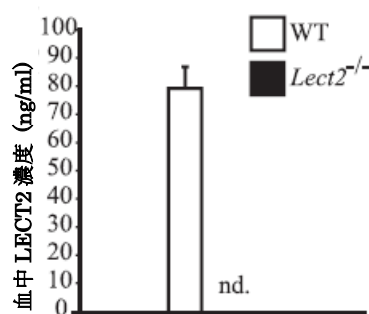


Figure 2.3 ワイルドタイプマウス及び LECT2 ノックアウトマウスの血中 LECT2 濃度.

2-6 血中インスリン濃度測定

血中インスリン濃度においては、RD 群、HFD 群、リバウンド群に 12 時間の絶食をかけ、麻酔下で心臓採血した血清サンプルを用いた。濃度測定には Mouse insulin ELISA kit (Morinaga Insutitute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan) を用い、検量線を作成して血中インスリン濃度を測定した(Fig 2.4)。測定波長として Measurement wavelength 450 nm, Reference wavelength 620 nm で測定した。

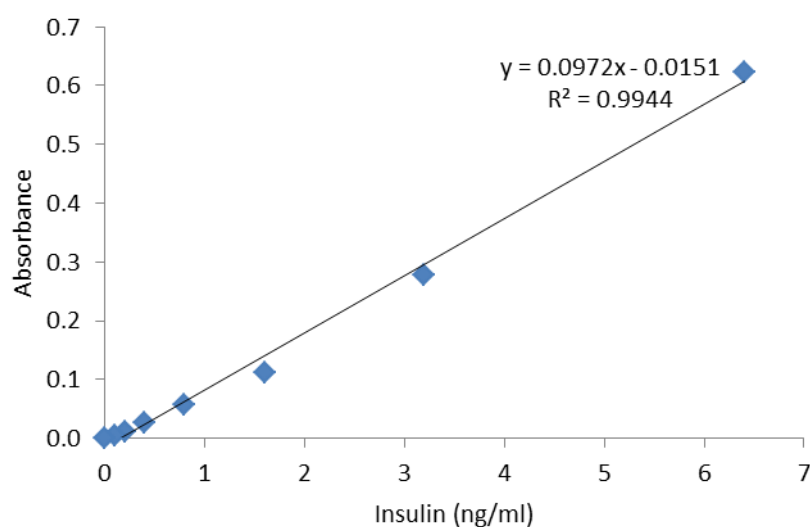


Figure 2.4. 血中インスリン濃度検量線

2-7 血中グルコース濃度測定

血中グルコース濃度測定においては、RD 群、HFD 群、リバウンド群に 12 時間の絶食をかけ、麻酔下で心臓採血した血清サンプルを用いた。測定には自己検査用グルコースキット・ダイアセンサー (Arkray, Inc, Kyoto, Japan)を用いた。

2-8 脂肪細胞直径測定

実験終了後、RD 群、HFD 群、リバウンド群それぞれを 12 時間の絶食をかけ、麻酔下でマウスを屠殺し、脂肪組織をサンプリングした。その際、内臓脂肪重量は右精巣周囲脂肪の重量を測定した。ホルマリン中に保存した脂肪組織から

パラフィン切片を作成し、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。脂肪細胞の直径においては、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 で脂肪組織切片の撮影をした後、BZ-II 解析アプリケーションを用いて測定した。各マウスの脂肪組織切片から 1 匹あたり 600 個の細胞の直径を測定し、各群 3 匹ずつ測定した。

2-9 マウス初代培養肝細胞

マウス初代培養肝細胞は 11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスから単離した。マウス 10 倍希釈ソムノペンチルを 10 μ l/g BW で腹腔内投与し、麻酔をかけた状態で以下の操作を行った。

マウスを正中切開し、下大静脈より前灌流液を灌流させ素早く門脈切開し脱血を行った。十分な脱血が出来た後、灌流液を本灌流液に交換し 3 分間灌流した。肝臓が腫脹し、その後張りが取れてきたら肝を切除した。

1. 前灌流液：1×SC-1

2. 本灌流液：1×HBSS+Collagenase (96 U/ml になるように調整)

灌流後の肝臓組織から以下の手順で肝細胞を採取した。

1. 4 °C の DMEM 中に灌流後の肝臓を入れ、肝細胞をバラバラにした。
2. 肝臓組織懸濁液を、100 μ m cell strainer に通して、50×g、2 min、4°C の条件で遠心分離を行った。
3. 上清を破棄し、25 mL の PBS で再懸濁した。
4. Percoll を用いて、細胞を分離し初代培養肝細胞を獲得した。
5. 得られた初代培養肝細胞はトリパンブルー染色で生細胞数をカウントし、Collagen coat した 12 well plate に播種した。

10×SC-1

ミリ Q	350 ml
NaCl	40 g
KCl	2 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.44 g
Na ₂ HPO ₄	0.62 g
HEPES	11.9 g
NaHCO ₃	1.75 g
EGTA	0.95 g
<u>Glucose</u>	<u>4.5 g</u>

NaOH で pH を 7.35-7.4 に調整→500 ml にメスアップし濾過滅菌

2-10 ラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 培養

ラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 を、Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM; Gibco)に 10% Fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100U/mL Penicillin (Gibco) 0.1 mg/mL Streptomycin (Gibco)を加え調整した培地を用いて、37℃、飽湿、5%CO₂-incubator (BNA-121D, TABAI ESPEC CORP, Osaka, Japan)内で培養し、3日ごとに培地交換を行った。

2-11 statistical analysis

すべての値を平均値 ± 標準誤差 (SE)として表した。得られた実験結果の統計解析には、SPSS (the Statistical Package for Social Science) を用いた。2群間の有意差はtwo-tailed Student's *t*-tests、3群間の有意差はone-way analysis of variance (ANOVA)により検定を行いpost-hoc testとしてTurkey's methodを用いた。血中LECT2濃度との相関検定には、Spearman's correlation coefficient 検定を行い、 $p < 0.05$ である場合を有意とした。

第三章 急激な栄養変化時の体重および血中 LECT2 濃度変化の検討

3-1 序章

LECT2 はこれまでの実験で肥満と深い関わりを持っていることが分かっている。先の論文において、血中 LECT2 濃度は肥満の指標である BMI や内臓脂肪蓄積を反映する腹囲と正相関する²⁷。マウスを用いた実験では、血中 LECT2 濃度は絶食時と比較して食後に上昇した。加えて、3 時間の運動は血中 LECT2 濃度を減少させた。さらに培養肝細胞を用いた実験では、*Lect2* 遺伝子発現は AMPK によって負に制御されていることを報告した²⁷。これらの結果は、全身のエネルギー状態が増加したときに LECT2 の産生が上昇することを示唆する。しかしながら、肥満によって誘導された LECT2 の過剰発現が、その後の体重減少時にどのように変化するかは未だ解明されていない。さらに、食餌の種類を切り替えたときの、急激な生体内栄養状態変化時の血中 LECT2 濃度の変化は解明されていない。本研究では、C57BL/6J マウスを用いて HFD をマウスに給餌し、食餌誘導性肥満マウスを誘導した後、食餌を RD に切り替えダイエットを行い、再び HFD に切り替えるリバウンドモデルマウスを作成し、急激な体重変化時の血中 LECT2 濃度の変化を検討した。

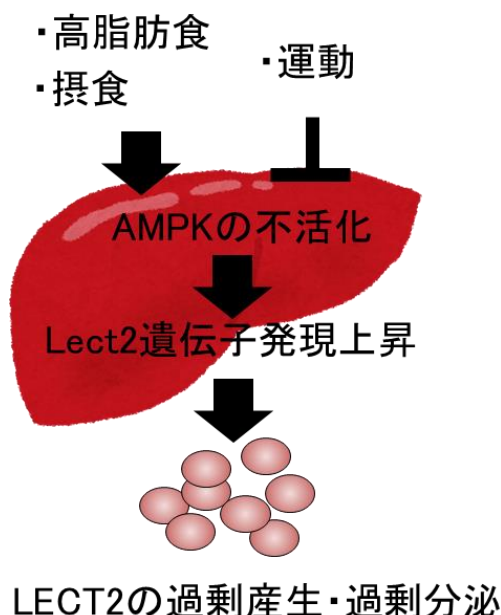


Figure 3.1.肝 LECT2 過剰産生機構.

3-2 実験方法

実験においては 6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。マウスを実験中 Regular diet (RD)を食べさせる RD 群、実験中 60% High fat diet (HFD)を食べさせる HFD 群、3 ヶ月間 HFD を給餌し十分な肥満を形成した後、体重が RD 群と同等まで低下するまでの 1 ヶ月間食餌を RD に切り替え、再び体重が HFD 群と同等まで上昇するまでの 40 日間食餌を HFD に切り替えたリバウンド群の 3 つにランダムに分けた。このとき食種変更時の体重及び血中 LECT2 濃度変化を検討した。

実験中、食餌は 3 日毎に新しいものに取り替えた。実験中の血中 LECT2 濃度測定のための血清サンプルは尻尾から採血し、すべて随時血を採取した。採取した血液を、4℃ 10000 rpm 10 min の条件で遠心分離し、血清サンプルを得た。血清は測定まで-80℃で保存した。

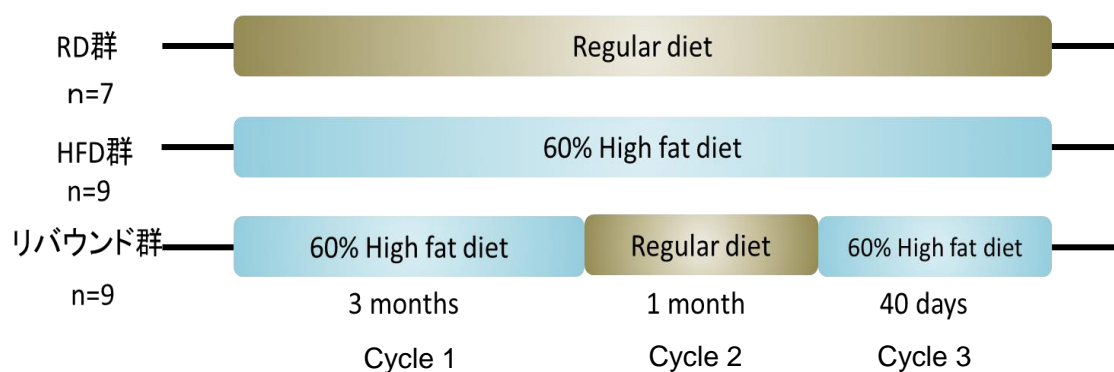


Figure 3.2.マウス実験プロトコル.

RD 群:実験中 RD を摂食したマウス(n=7)。

HFD 群:実験中 HFD を摂食したマウス(n=9)。

リバウンド群: Cycle 1 においては、十分な肥満を形成させるため 3 ヶ月間 HFD を給餌した。Cycle 2 においては、リバウンド群の食餌を体重が RD 群と同等になるまでの 1 ヶ月間 RD に切り替えた。Cycle 3 においては、リバウンド群の食餌を体重が HFD 群と同等になるまでの 40 日間 HFD に切り替えた(n=9)。

3-3 結果

3-3-1 リバウンドモデルマウスの作成

本実験ではマウスの食餌を3つの Cycle に分け、リバウンド群に対して Cycle 1 では3ヶ月間の HFD を給餌し、その後 Cycle 2 では1ヶ月間の RD の給餌に切り替え、その後 cycle 3 において再び40日間の HFD を給餌し、リバウンドモデルマウスを作成した。

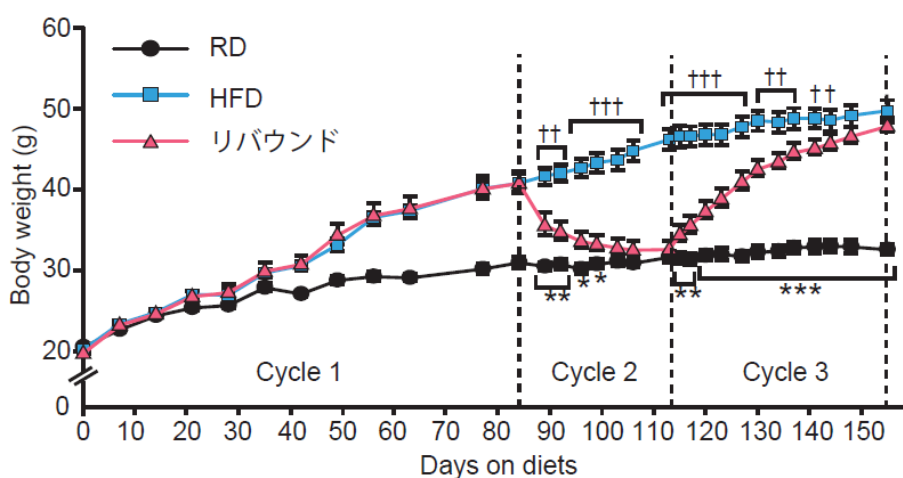


Figure 3.3.食種変更中のマウス体重変化

リバウンド群に対して Cycle 1 においては、十分な肥満を形成させるため3ヶ月間 HFD を給餌した。Cycle 2 においては、リバウンド群の食餌をリバウンド群の体重が RD 群の体重と同等になるまでの1ヶ月間 RD に切り替えた。Cycle 3 においては、リバウンド群の食餌をリバウンド群の体重が HFD 群の体重と同等になるまでの40日間 HFD に切り替えた。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ RD 群 vs リバウンド群

† $p<0.05$, †† $p<0.01$, ††† $p<0.001$ HFD 群 vs リバウンド群

Cycle 1 においては、RD 群には RD を HFD 群及びリバウンド群には HFD を3ヶ月間給餌した。Cycle 1 において、HFD 摂取した HFD 群およびリバウンド群の体重がなだらかに上昇することを確認し、3ヶ月間の HFD 摂取後においては、HFD 群およびリバウンド群の体重と RD 群の体重と比較した結果、HFD 群及びリバウンド群において有意な体重増加を確認した(Fig 3.3)。また Cycle 1 終了時において、HFD 群とリバウンド群の2群間には体重差がないことを確認

した(Fig 3.4.A)。

Cycle 2 においては、RD 群には RD を、HFD 群には HFD を、リバウンド群においては食餌を HFD から RD に切り替え、1 ヶ月間各群のマウスに給餌した。Cycle 2 において RD 群では顕著な体重変化は確認されず、体重は 30 g 前後で推移した(Fig 3.3)。Cycle 2 において、HFD 群の体重がなだらかに上昇することを確認し、Cycle 2 期間中で約 5 g の体重増加を確認した(Fig 3.3)。リバウンド群の食餌は Cycle 2 開始時に HFD から RD に切り替えた。Cycle 2 開始から 5 日目の時点におけるリバウンド群の体重と HFD 群と体重を比較すると、リバウンド群の体重において有意な体重減少を確認した(Fig 3.3)。その後、リバウンド群の体重がなだらかに減少することを確認した(Fig 3.3)。また Cycle 2 終了時にリバウンド群の体重が RD 群の体重と同等まで低下していることを確認した(Fig 3.4.B)。

Cycle 3 においては、RD 群には RD を、HFD 群には HFD を、リバウンド群においては食餌を RD から HFD に切り替え、40 日間各群のマウスに給餌した。

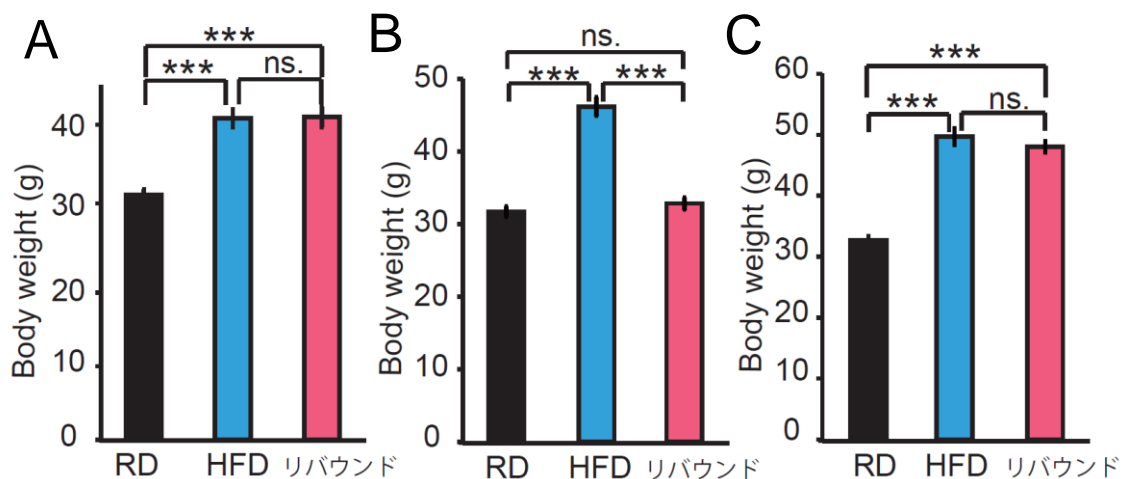


Figure 3.4.食種変更時のマウス体重

A: 3 ヶ月間 HFD を給餌した cycle1 の終了時点の 3 群のマウス体重

A: 3 ヶ月間 HFD を給餌した後に 1 ヶ月間の RD を給餌した cycle2 の終了時点の 3 群のマウス体重

A: 3 ヶ月間 HFD を給餌した後に 1 ヶ月間の RD を給餌し、再び 40 日間 HFD を給餌した cycle3 の終了時点の 3 群のマウス体重

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ns: not significant.

Cycle 3 において RD 群では顕著な体重変化は確認されず、体重は 30 g 前後で推移した(Fig 3.3)。Cycle 3 において、HFD 群では体重がなだらかに上昇す

ることを確認し、Cycle 3 期間中で約 3 g の体重増加を確認した(Fig 3.3)。リバウンド群の食餌は Cycle 3 開始時に RD から HFD に切り替えた。Cycle 3 開始から 4 日目の時点におけるリバウンド群の体重と RD 群の体重を比較すると、リバウンド群の体重において有意な体重増加を確認した(Fig 3.3)。その後、リバウンド群の体重が緩やかに上昇することを確認し、Cycle 3 終了時まで増加し続けたことを確認した (Fig 3.3)。また Cycle 3 終了時にリバウンド群の体重が HFD 群の体重と同等まで上昇していることを確認した(Fig 3.4.C)。

マウスに給餌する食種を 3 cycle で変化させたことにより、マウス体重の減少及び再増加を誘導し、リバウンドモデルマウスを獲得した。

3-3-2 実験中のマウス摂食量

先の実験ではマウスの食餌を 3 つの cycle に分け、リバウンド群に対して Cycle 1 では 3 ヶ月間の HFD を給餌し、その後 Cycle 2 では 1 ヶ月間の RD の給餌に切り替え、その後 Cycle 3 において再び 40 日間の HFD を給餌し、リバウンドモデルマウスを作成した。マウスの食種を変更することで Cycle 2 では体重の減少、Cycle 3 においてはマウス体重の再増加が確認された。この結果より、各 cycle において、摂食量に変化していることが考えられる。そこで、リバウンドモデルマウスの作成において食種変更を行った各 cycle における摂食量を測定した。

Cycle 2 ではリバウンド群の食餌を HFD から RD に切り替えた。このときのリバウンド群における 1 日あたりの摂取カロリーにおいては、RD 群および HFD 群の 1 日あたりの摂取カロリーと比較すると、リバウンド群で有意な減少が確認された(Fig 3.5.A)。さらに、このとき RD 群の 1 日あたりの摂取カロリーは HFD 群と比較すると、RD 群において有意な減少を確認した(Fig 3.5.A)。

Cycle 3 ではリバウンド群の食餌を RD から HFD に切り替えた。このときのリバウンド群における 1 日あたりの摂取カロリーにおいては、RD 群および HFD 群の 1 日あたりの摂取カロリーと比較すると、リバウンド群で有意な増加を確認した(Fig 3.5.B)。さらに、このとき RD 群の 1 日あたりの摂取カロリーは HFD 群と比較すると、RD 群において有意な減少を確認した(Fig 3.5.B)。

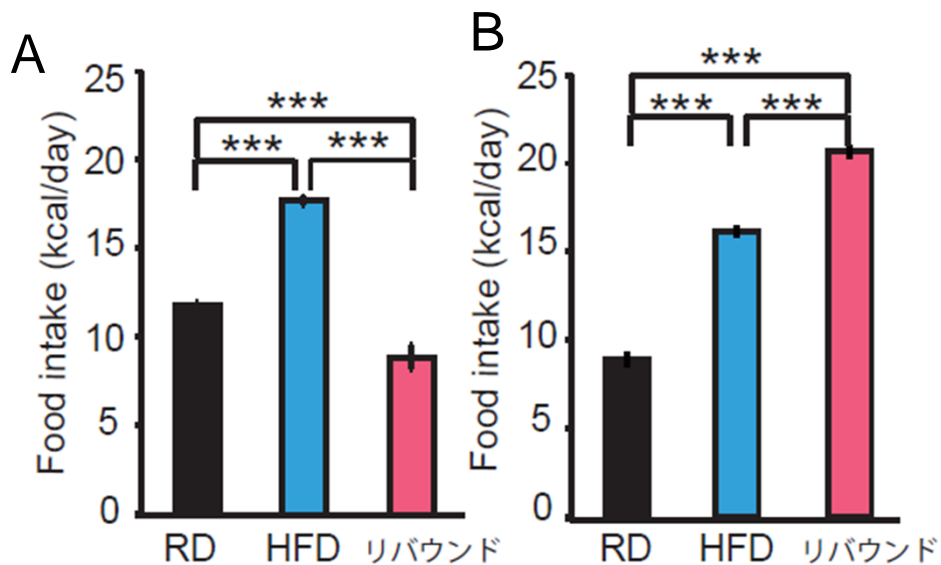


Figure 3.5.食種変更後のマウス摂食量

摂食量は、各 cycle 中に 3 日毎に測定した。RD は 357 kcal/100 g、HFD は 524 kcal/100 g で計算し、1 日あたりの摂取カロリーを算出した。

A: Cycle 2 期間中の 1 日あたりの摂取カロリー

B: Cycle 3 期間中の 1 日あたりの摂取カロリー

*** $p < 0.001$

3-3-3 食種変更時の体重及び血中 LECT2 濃度変化

先の実験ではマウスの食餌を 3 つの cycle に分け、リバウンド群に対して Cycle 1 では 3 ヶ月間の HFD を給餌し、その後 Cycle 2 では 1 ヶ月間の RD の給餌に切り替え、その後 Cycle 3 において再び 40 日間の HFD を給餌し、リバウンドモデルマウスを作成した。マウスの食種を変更することで Cycle 1 では体重の増加による肥満の形成、Cycle 2 では体重の減少、Cycle 3 においてはマウス体重の再増加が確認された。これまでに、肥満によって誘導された LECT2 の過剰発現が、その後の体重減少時にどのように変化するかは解明されていない。さらに、食餌の種類を切り替えたときの、急激な生体内栄養状態変化時の血中 LECT2 濃度の変化は解明されていない。そこで本実験では、肥満形成後の体重減少及び体重減少後の体重再増加時における血中 LECT2 濃度の変化を検討した。

Cycle 1 終了時点での血中 LECT2 濃度においては、HFD 群及びリバウンド群と RD 群を比較すると、HFD 群及びリバウンド群において血中 LECT2 濃度の有意な上昇を確認した(Fig 3.6)。

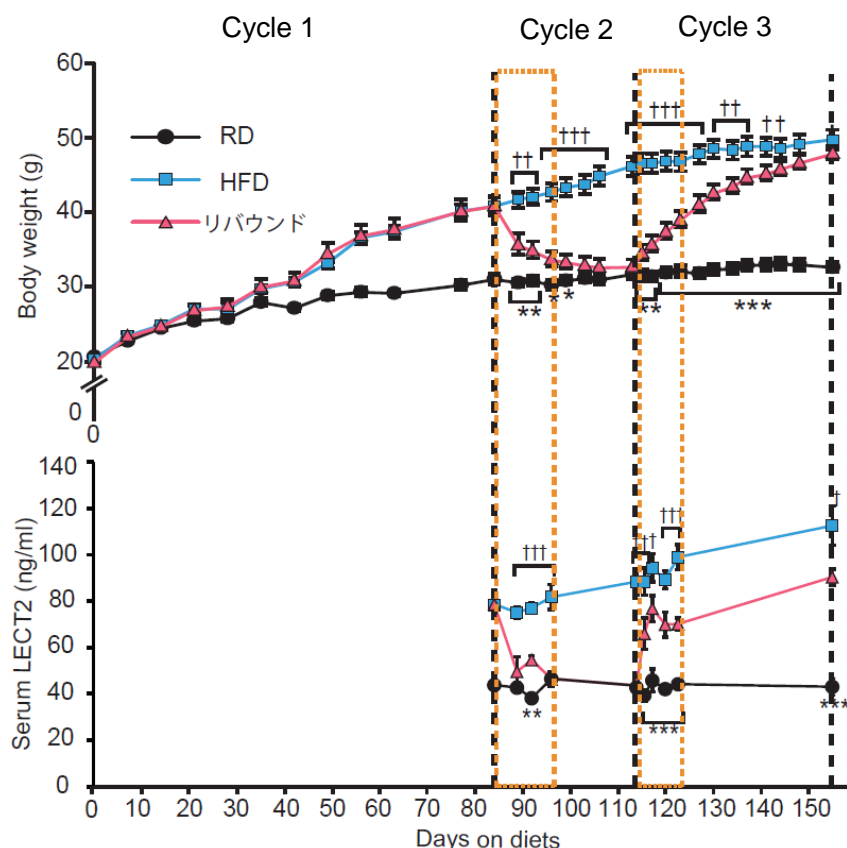


Figure 3.6.食種変更中のマウス体重変化と血中 LECT2 濃度変化

血中 LECT2 濃度は、食種を HFD から RD に切り替えた Cycle 2、食種を RD から HFD に切り替えた Cycle 3 において測定した。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ RD 群 vs リバウンド群

† $p<0.05$, †† $p<0.01$, ††† $p<0.001$ HFD 群 vs リバウンド群

リバウンド群の食餌を HFD から RD に切り替えた Cycle 2 開始後 5 日目の時点でのリバウンド群の体重においては、HFD 群と比較すると有意に減少し、RD 群と比較すると有意な高値を示したことを確認した(Fig 3.6)。その後、体重はなだらかに減少し Cycle 2 開始時から 30 日でリバウンド群の体重は RD 群と同等まで低下することを確認した(Fig 3.6)。その一方で、Cycle 2 開始後 5 日目の時点でのリバウンド群の血中 LECT2 濃度は Cycle 2 開始時から急激に減少し、HFD 群と比較すると有意に減少し、RD 群と比較すると同等の濃度を示した(Fig

3.6)。その後、リバウンド群の血中 LECT2 濃度において Cycle 2 開始時から 8 日目にはわずかな上昇を確認したが、10 日目には再び RD 群と同等まで低下することを確認した(Fig 3.6)。

リバウンド群の食餌を RD から HFD に切り替えた Cycle 3 開始後 4 日目時点でのリバウンド群の体重においては、RD 群と比較して有意に上昇し、HFD 群と比較すると有意な低値を示したことを確認した(Fig 3.6)。その後、体重はなだらかに上昇し、Cycle 3 開始時から 40 日で HFD 群と同等まで上昇することを確認した(Fig 3.6)。その一方で、Cycle 3 開始後 4 日目の時点でのリバウンド群の血中 LECT2 濃度においては、Cycle 3 開始後急激に上昇し、RD 群比較すると約 1.6 倍まで上昇することを確認した(Fig 3.6)。その後、リバウンド群の血中 LECT2 濃度においては、Cycle 3 の 4 日目以降上昇することを確認した(Fig 3.6)。しかしながら、Cycle 3 開始時から 40 日目におけるリバウンド群の血中 LECT2 濃度においては、HFD 群と比較すると体重が同等にもかかわらず有意な低値を示したことを確認した(Fig 3.6)。

3-4 考察

本実験では食種変更により、急激な体重変化を起こすリバウンドマウスモデルを作成し、食種変化時における摂食量の変化や体重の変化および血中 LECT2 濃度変化を検討した。

リバウンド群の食餌を 3 ヶ月の HFD から RD に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに減少し切り替え後 30 日で RD 群と同等まで低下した一方で、血中 LECT2 濃度は切り替え後急激に減少し、10 日目には RD 群と同等まで低下した。さらに、リバウンド群の食餌を 1 ヶ月間の RD から HFD に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに上昇し切り替え後 40 日で HFD 群と同等まで上昇した一方で、血中 LECT2 濃度は切り替え後急激に上昇し、切り替え後 4 日目には RD 群と比較すると約 1.6 倍まで上昇した。この結果は、血中 LECT2 濃度は体重よりも早期にダイナミックに変化することを示唆する。このことは、血中 LECT2 は体重に先行して生体内の栄養状態を反映し、後の体重変化を予測出来る可能性を示唆する。

現在、臨床において生体内の栄養状態を反映するマーカーとして栄養アセスメント蛋白が用いられている。プレアルブミンやレチノール結合蛋白などの栄養アセスメント蛋白は半減期が短いという特徴を有しており、栄養アセスメントタンパク量の低下は栄養飢餓状態を示す^{49,51}。主に、高齢者や術後といった低栄養状態時の栄養指導において、栄養アセスメント蛋白は用いられている。しかしながら、肥満や 2 型糖尿病といった過栄養状態時の栄養マーカーは未だに報告されていない。本実験結果は、LECT2 が過栄養状態時の栄養状態を反映する過栄養マーカーとして実臨床で応用できる可能性を示唆する。

肥満症や 2 型糖尿病に対して、食事療法は非常に効果的な治療である。バランスのとれた食事は、体重減少のみならず様々な疾患にも有益な効果をもたらす。患者が入院時ならば病院食などバランスのとれた食事を提供することで、栄養管理を行うことは出来るが、患者が通院によって栄養指導を受ける場合は、その栄養管理は患者自身が行うことになる。しかしながら、実際に患者自身が正確に栄養管理できているかを判断するのは難しく、体重の変化から客観的に判断するしかない。このとき、食事療法の効果を反映する過栄養マーカーが重要である。本実験結果は、高カロリーの食事から正常食に切り替えることで、LECT2 は急激に低下したことから、LECT2 は食種の変更に鋭敏に反応するマーカーであり、食事療法の効果を反映するマーカーとなり得る可能性を示唆する。血中 LECT2 濃度を測定することは、患者の食事療法遵守度を判断でき、適切な栄養指導の指標となり得る可能性がある。

食事療法によってダイエットを成功させても、バランスのとれた食生活が継続せずに再び体重が増加するリバウンドがたびたび起こる。本実験結果は、ダイエット後のリバウンド時に血中 **LECT2** 濃度が急激上昇することを示し、血中 **LECT2** 濃度を測定することは、ダイエット後のリバウンドを予知するマーカーとして応用できる可能性を示唆する。

ヒトの栄養指導時に対するさらなる **LECT2** の研究が、**LECT2** が過栄養マーカーとして応用できることに必要であると考ええる。

第四章 リバウンドによる各組織での影響

4-1 序章

肥満症に対して食事療法や運動療法は非常に効果的である⁵²。しかしながら、ダイエットを成功させても、再び体重が増加するリバウンドがたびたび起こる。リバウンドについての研究はこれまで多く報告されており、リバウンドは2型糖尿病のリスクになるという報告もある^{45,46}。しかしながら、ヒトの研究においてリバウンド後でもダイエットによる脂肪肝改善効果は維持されたままであるという報告もあり⁴⁷、リバウンドが悪なのか善なのかの議論は未だに決着はついていない。そこで本研究では、リバウンドマウスモデルを用いて単回のリバウンドが生体に及ぼす影響を検討した。

4-2 実験方法

リバウンドモデルマウスは3-2項で作成したマウスを用いた。リバウンド実験終了後、各群のマウスに12時間の絶食を与え、麻酔下で心臓採血した後に頸椎脱臼を行い、各臓器をサンプリングした。臓器を採取後すぐに凍結保存し、各種測定まで-80℃で保存した。採取した血液を、4℃ 10000 rpm 10 min の条件で遠心分離し、血清サンプルを得た。血清を測定まで-80℃で保存した。

血清サンプルにおいては、血中 LECT2 濃度、血中インスリン濃度、血中グルコース濃度を測定した。肝臓組織では、肝臓中性脂肪含有量及び各種肝遺伝子発現を検討した。脂肪組織では、脂肪組織重量、脂肪細胞の直径、各種遺伝子発現を検討した。

4-3 結果

4-3-1 リバウンドが LECT2 産生に及ぼす影響

本実験では、単回のリバウンドを負荷したリバウンドモデルマウスを作成し、リバウンドが LECT2 産生に対してどのような影響を与えるかを検討した。

実験終了後、食後の血中 LECT2 濃度においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意な上昇を確認した(Fig 4.1)。さらに、食後の血中 LECT2 濃度においては、HFD 群と比較するとリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意な減少を確認した(Fig 4.1)。絶食時でも同様の傾向が見られ、絶食時の血中 LECT2 濃度においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意な上昇を確認した(Fig 4.1)。さらに、絶食時の血中 LECT2 濃度においては、HFD 群と比較するとリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意な減少を確認した(Fig 4.1)。さらに、血中 LECT2 濃度においては、食後と絶食で比較すると、3 群ともに絶食状態で有意な減少を確認した(Fig 4.1)。

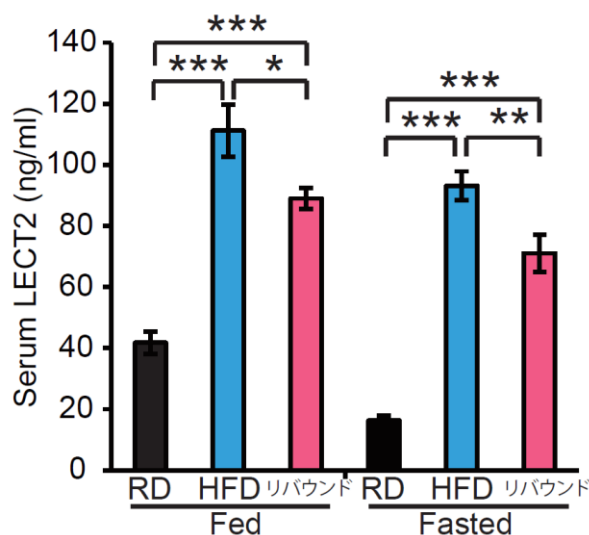


Figure 4.1. リバウンド実験後のマウス血中 LECT2 濃度

血中 LECT2 濃度測定のための血清をマウス屠殺 3 日前に食後(Fed)で尻尾より採血した。実験終了時には 12 時間の絶食(Fasted)をかけ、麻酔下でマウスを屠殺し、心臓採血を行った。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

リバウンド実験終了後、絶食時の血中 LECT2 濃度においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意に上昇し、さらに、絶食時の血中 LECT2 濃度においては、HFD 群と比較するとリバウンド群の血中 LECT2 濃度の有意な減少を確認した。LECT2 は肝細胞特異的に発現していることが知られ²¹、血中に存在する LECT2 はほぼ肝臓由来である。そこで、肝臓における *Lect2* 遺伝子発現を Real-time PCR を用いて測定した。

肝臓 *Lect2* 遺伝子発現においては、RD 群と HFD 群およびリバウンド群で比較すると、RD 群で *Lect2* 遺伝子発現の有意な減少が確認された(Fig 4.2)。また、肝臓 *Lect2* 遺伝子発現においては、HFD 群とリバウンド群で比較すると、リバウンド群で *Lect2* 遺伝子発現の有意な減少が確認された(Fig 4.2)。血中 LECT2 濃度と肝臓 *Lect2* 遺伝子発現においては、同様の傾向を確認し、リバウンド群においては、RD 群より有意に増加し、HFD 群と比較すると有意に減少した。

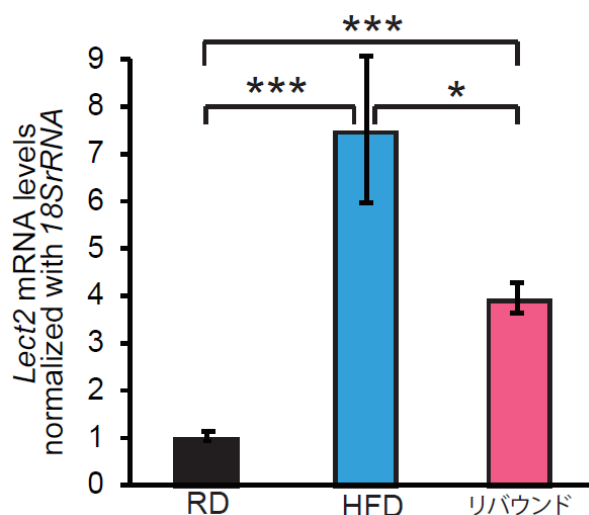


Figure 4.2.リバウンド実験後のマウス肝臓 *Lect2* 遺伝子発現

実験終了後、マウス肝臓組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。肝臓における *Lect2* 遺伝子発現量を Realtime-PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18SrRNA* 発現量を用いて補正した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

血中 LECT2 濃度と肝臓 *Lect2* 遺伝子発現においては、傾向は同様であるが、各群におけるそれぞれの割合に違いが確認された。RD 群と HFD 群においては、血中 LECT2 濃度が HFD 群で約 5 倍に対し、*Lect2* 遺伝子発現は約 7 倍であった。RD 群とリバウンド群においては、血中 LECT2 濃度がリバウンド群で約 4 倍に対し、*Lect2* 遺伝子発現は約 4 倍であった。しかしながら、リバウンド群と

HFD 群においては、血中 LECT2 濃度が HFD 群で約 1.3 倍に対し、*Lect2* 遺伝子発現は約 2 倍であった。

4-3-2 リバウンドが血中インスリン濃度および血中グルコース濃度に与える影響

これまでの結果において、リバウンド群のマウスにおいては、HFD 群と比較して、血中 LECT2 濃度及び肝臓 *Lect2* 遺伝子発現の有意な減少を確認した。また、LECT2 は骨格筋特異的にインスリン抵抗性を惹起する因子として知られている²⁷。この結果は、リバウンドは肝臓の LECT2 産生を抑制することから生体にとって良い効果を持っていることを示唆する。そこで、リバウンドによる LECT2 産生減少によって、インスリン抵抗性の改善が見られているかを検討するために、リバウンドが血中インスリン濃度および血中グルコース濃度に与える影響を検討した。

実験終了後、血中インスリン濃度においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群において有意な増大を確認した(Fig 4.3.A)。さらに血中インスリン濃度においては、HFD 群と比較するとリバウンド群の血中インスリン濃度の低下傾向を確認した(Fig 4.3.A)。

実験終了後、血中グルコース濃度においては、RD 群と比較して HFD 群およびリバウンド群において有意な増大を確認した(Fig 4.3.B)。一方で、血中グルコース濃度においては、リバウンド群と HFD 群間に有意な差は確認しなかった(Fig 4.3.B)。

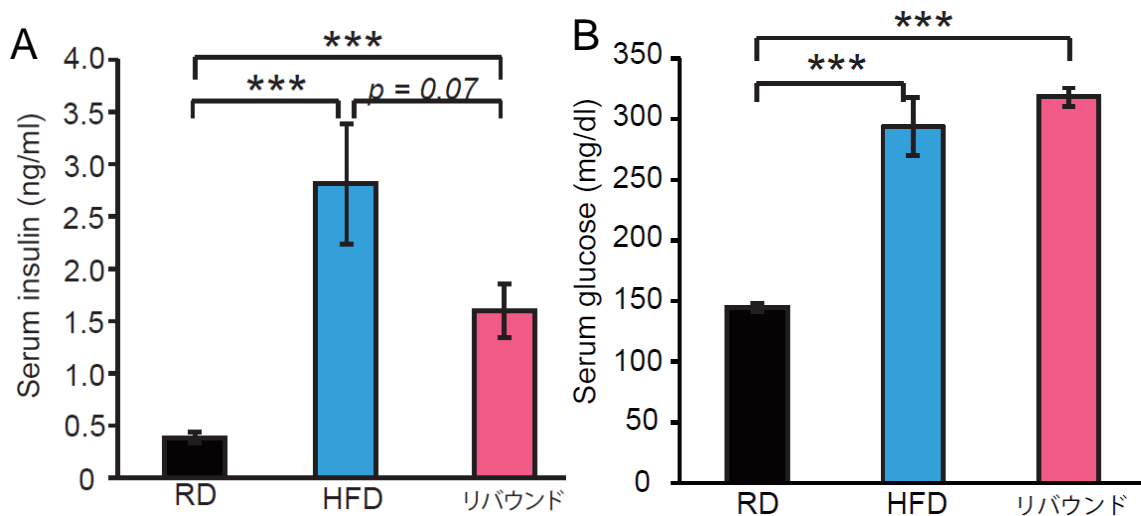


Figure 4.3.リバウンド実験後のマウス血中インスリン濃度及び血中グルコース濃度
実験終了後、12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い、血液を採取した。採取した血液から遠心分離法で血清を分離し、インスリン濃度及びグルコース濃度を測定した。

A:マウス血中インスリン濃度

B:マウス血中グルコース濃度

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4-3-3 リバウンドが脂肪肝に与える影響

これまでの既報で、ヒトにおいて脂肪肝の患者で血中 LECT2 濃度が上昇していることが報告されている⁵³。本実験で用いた単回のリバウンドを負荷したリバウンド群においては、HFD 群と比較して血中 LECT2 濃度の有意な減少が確認された。この結果は、リバウンド群では血中 LECT2 濃度の低下及び肝臓の脂肪蓄積の改善がしていることを示唆する。そこで本実験において、リバウンドが肝臓の脂肪蓄積に対して与える影響を検討するために、肝臓での中性脂肪 (Triglyceride) 含有量を測定した。

肝臓では肝細胞に中性脂肪が蓄積した状態を脂肪肝とされ、肝臓内中性脂肪含有量の増加は脂肪肝の増悪を示す。肝臓内中性脂肪含有量においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群で有意な増大を確認した (Fig 4.4)。さらに、肝臓内中性脂肪含有量においては、HFD 群と比較するとリバウンド群で有意な減少を確認した (Fig 4.4)。

肝臓内中性脂肪の蓄積の結果から、リバウンド群においては HFD 群と比較すると脂肪肝の改善を確認した。そこで、リバウンド群の肝臓における中性脂肪

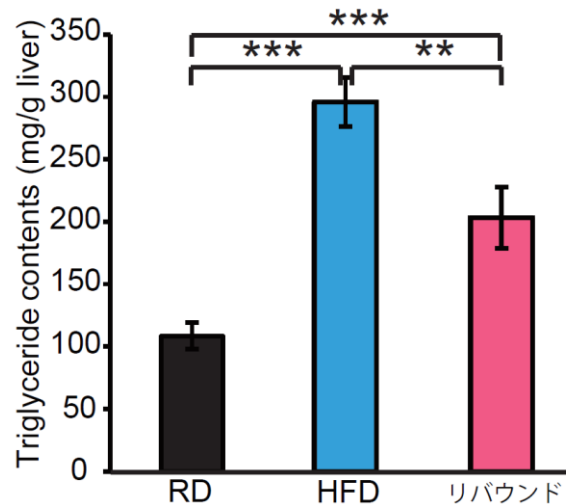


Figure 4.4. リバウンド実験後のマウス肝臓内 Triglyceride 含有量

実験終了後、マウス肝臓組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。肝臓内中性脂肪含有量を Triglyceride E-test WAKO kit を用いて測定した。得られた測定値は、測定に用いた肝重量で補正した。

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

蓄積の改善が脂質合成の低下によるかを検討するために、脂質合成関連遺伝子の発現量を Real-time PCR を用いて検討した。

脂質合成関連遺伝子である Sterol regulatory element binding protein-1c (Srebp1c:encoded by *srebf1*)は脂肪酸合成の主要な制御因子であり、肝臓内脂肪合成に密接に関わっている⁵⁴。*Srebf1* 遺伝子発現増強は、肝臓内脂肪合成を亢進し、肝臓内中性脂肪含有量を増悪させる。*Srebf1* 遺伝子発現においては、RD 群と比較すると HFD 群で有意な増大を確認した(Fig 4.5)。さらに、*Srebf1* 遺伝子発現においては、HFD 群と比較するとリバウンド群で低下傾向を確認した(Fig 4.5)。

脂質合成関連遺伝子である Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ :encoded by *pparg*)は脂質合成遺伝子の主要な調節因子である⁵⁵。*Pparg* 遺伝子発現においては RD 群と比較して HFD 群で有意な増大を確認した(Fig 4.6)。さらに *pparg* 遺伝子発現においては、HFD 群と比較するとリバウンド群で有意な低下を確認した(Fig 4.6)。

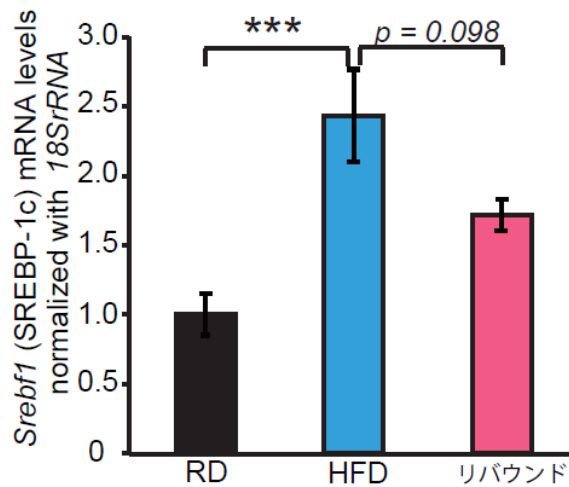


Figure 4.5.リバウンド実験後のマウス肝臓における *srebf1* 遺伝子発現量

実験終了後、マウス肝臓組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。肝臓における *srebf1* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18SrRNA* 発現量を用いて補正した。

p<0.01, *p<0.001

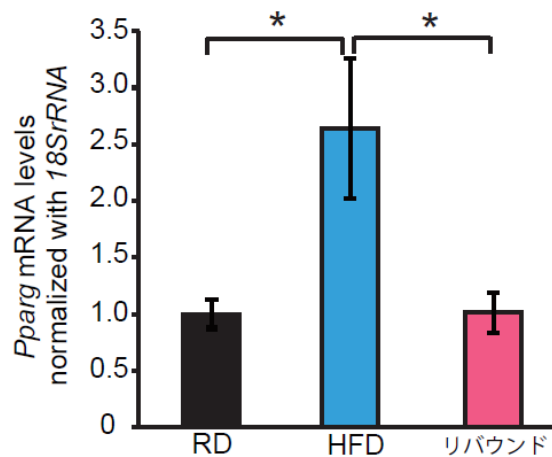


Figure 4.6.リバウンド実験後のマウス肝臓における *pparg* 遺伝子発現量

実験終了後、マウス肝臓組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。肝臓における *pparg* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18SrRNA* 発現量を用いて補正した。

p<0.01, *p<0.001

肝臓における脂質合成遺伝子である *srebf1* 及び *pparg* 遺伝子発現においては HFD 群と比較するとリバウンド群で有意な減少を確認した。この結果は、リバ

ウンド群における肝臓中性脂肪蓄積の減弱は、リバウンド群の肝臓での *de novo* の脂質合成の低下による影響であることを示唆する。さらに、リバウンド後の肝臓の脂肪蓄積の減弱の詳細なメカニズムを検討するために、脂質代謝関連遺伝子の発現を Real-time PCR を用いて検討した。

Carnitine palmitoyl transferase 1a (cpt1a:encoded by *cpt1a*)は脂質代謝関連遺伝子であり、ミトコンドリア内膜に存在する蛋白質で β 酸化を制御する蛋白である⁵⁶。*Cpt1a* 遺伝子発現においては、RD 群と比較して HFD 群およびリバウンド群で有意な低下を確認した(Fig 4.7)。一方で、*Cpt1a* 遺伝子発現においては、HFD 群とリバウンド群で有意な差は確認されなかった(Fig 4.7)。

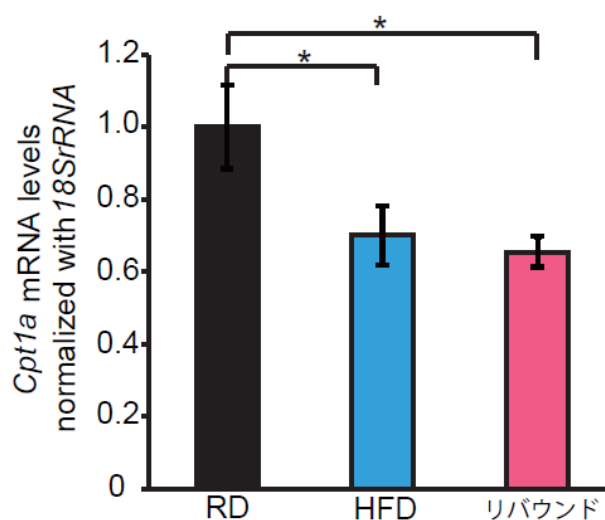


Figure 4.7.リバウンド実験後のマウス肝臓における *cpt1a* 遺伝子発現量

実験終了後、マウス肝臓組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。肝臓における *cpt1a* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18SrRNA* 発現量を用いて補正した。

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4-4-4 リバウンドが脂肪組織に与える影響

これまでの報告で、リバウンドをすることはさらなる肥満を導き、生体に悪影響をもたらしていると報告されている⁵⁷。しかしながら、これまでの実験ではリバウンドは肝臓では脂肪蓄積を抑制する良い影響を与えていることが明らかになった。そこで次に、脂肪組織に対するリバウンドの影響を検討するために、内臓脂肪の蓄積量を測定した。

実験終了時、HFD 群及びリバウンド群の体重に有意な差は確認されていない (Fig 3.4.C)。このとき内臓脂肪重量においては、RD 群と比較すると HFD 群およびリバウンド群で有意な減少を確認した (Fig 4.8)。さらに、内臓脂肪重量においては、HFD 群と比較するとリバウンド群で有意な増大を確認した (Fig 4.8)。

この結果は、リバウンド群においては HFD 群と比較して、体重が同じにもかかわらず、内臓脂肪が蓄積していることを示唆した。

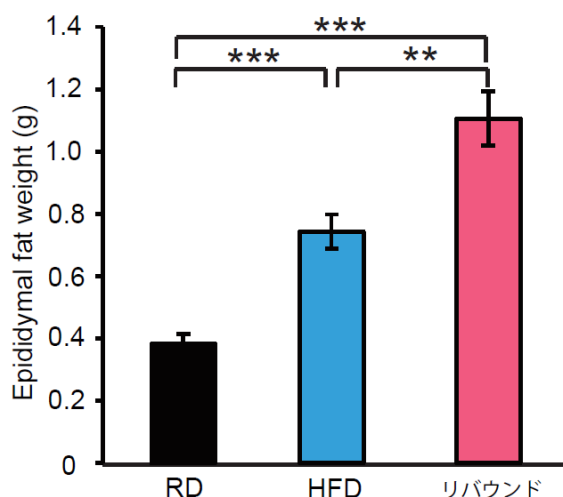


Figure 4.8. リバウンド実験後の内臓脂肪量

実験終了後、マウス内臓脂肪組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。マウス脂肪組織は、右精巣周囲脂肪を採取し、重量を測定した。

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

リバウンド実験の結果、リバウンド群において内臓脂肪の蓄積の増悪を確認した。脂肪重量の増加及び脂肪細胞の肥大化はインスリン抵抗性を誘導することが知られている⁵⁸。そこで、リバウンド群において脂肪細胞の肥大化を検討するため、脂肪細胞の直径を測定した。脂肪細胞直径において、RD 群では 100 μm 以下の直径を有する脂肪細胞を多く確認した (Fig 4.9)。脂肪細胞直径におい

て、RD 群と比較すると、HFD 群およびリバウンド群において 100 μm 以下の脂肪細胞数は減少し、100 μm 以上の脂肪細胞数の増大を確認した(Fig 4.9)。さらに脂肪細胞直径において、HFD 群と比較するとリバウンド群において 130 μm 以上の脂肪細胞数の増大を確認した(Fig 4.9)。

脂肪細胞の直径の平均値においては、RD 群と比較すると HFD 群及びリバウンド群で有意な増大を確認した(Fig 4.10)。さらに、脂肪細胞の直径の平均値においては、HFD 群と比較するとリバウンド群で有意な増大を確認した(Fig 4.10)。

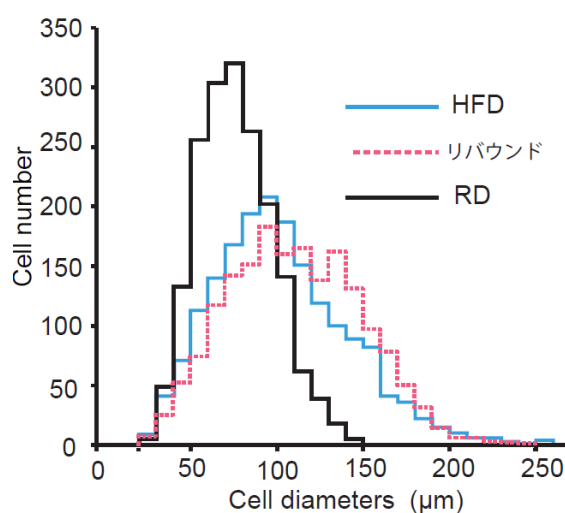


Figure 4.9. リバウンド実験後の内臓脂肪細胞の直径

実験終了後、マウス内臓脂肪組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。マウス脂肪組織は、右精巣周囲脂肪を採取した。採取した脂肪組織からパラフィン切片を作成し、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。得られた標本の脂肪細胞直径を各群 1 匹あたり 600 細胞測定し、各群 3 匹測定した。測定値からヒストグラムを作成した。

リバウンド実験の結果、リバウンド群においては、HFD 群と比較して、内臓脂肪重量の増加及び内臓脂肪細胞の肥大化を確認した。これらの結果は、リバ

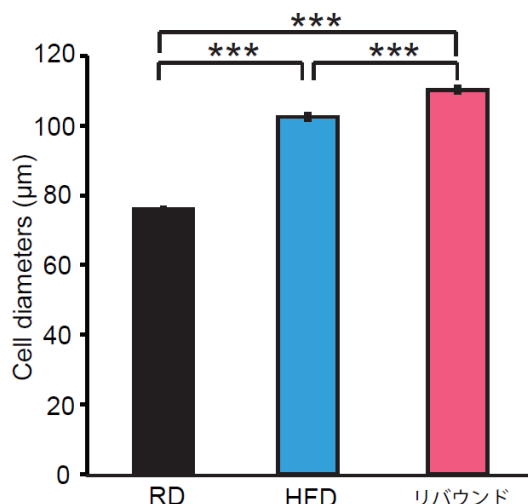


Figure 4.10.リバウンド実験後の内臓脂肪細胞の直径

実験終了後、マウス内臓脂肪組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。マウス脂肪組織は、右精巣周囲脂肪を採取した。採取した脂肪組織からパラフィン切片を作成し、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。得られた標本の脂肪細胞直径を各群 1 匹あたり 600 細胞測定し、各群 3 匹測定した。各群の測定値から平均値を算出した。

ウンドは内臓脂肪の蓄積を増悪させ、脂肪細胞の肥大化を誘導することを示唆する。内臓脂肪の蓄積や脂肪細胞の肥大化は、脂肪組織から分泌される善玉アディポカインであるアディポネクチンの分泌量を低下させ、生体内でインスリン抵抗性を惹起することが報告されている¹³。そこで、脂肪組織におけるアディポカイン遺伝子発現を Real-time PCR を用いて測定した。

善玉アディポカインである adiponectin (encoded by *adipoq*)は脂肪組織から分泌され、生体内でインスリン感受性の向上やエネルギー消費の亢進など生体にとって有益な効果をもたらすアディポカインである⁵⁹。*Adipoq* 遺伝子発現においては、RD 群と比較して HFD 群およびリバウンド群で有意な低下を確認した(Fig 4.11.A)。一方で *Adipoq* 遺伝子発現においては、リバウンド群と HFD 群では有意な差を確認できなかった(Fig 4.11.A)。

脂肪組織における Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ ; encoded by *pparg*)はアディポジェネシスを亢進し、脂肪細胞の小型化する転写因子である。さらに、善玉アディポカインであるアディポネクチンの産生を制御する転写因子である⁶⁰。*Pparg* 遺伝子発現においては、RD 群と比較して HFD 群およびリバウンド群で有意な低下を確認した(Fig 4.11.B)。一方で *pparg*

遺伝子発現においては、リバウンド群と HFD 群では有意な差を確認できなかった(Fig 4.11.B)。この結果は、リバウンド群においては、HFD 群と比較すると脂肪重量の増加及び脂肪細胞の肥大化を確認したが、善玉アディポカインであるアディポネクチンの発現量では差がないことを示唆する。

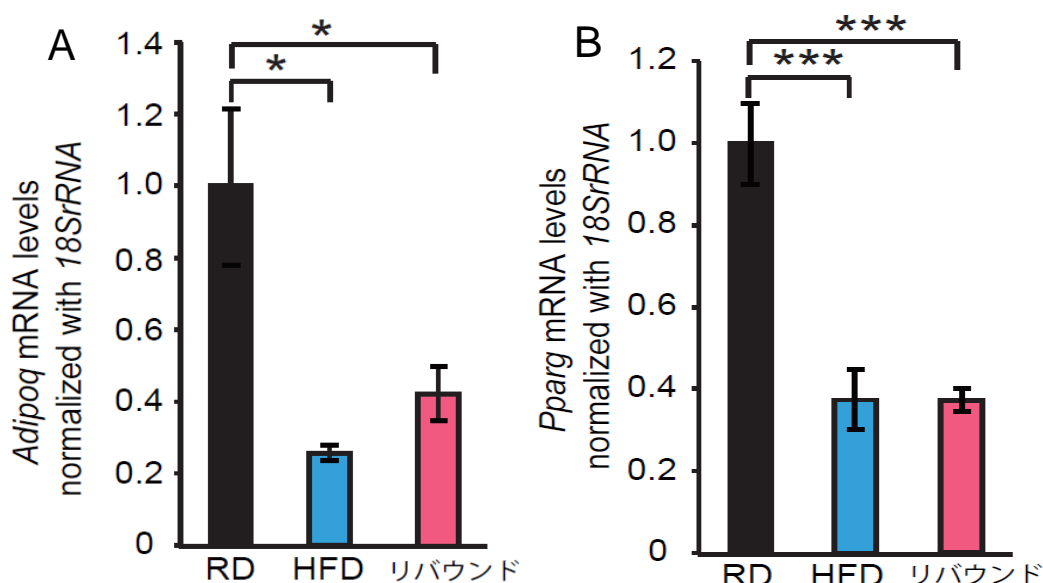


Figure 4.11.リバウンド実験後のマウス脂肪組織における *adipoq* 及び *pparg* 遺伝子発現量

実験終了後、マウス内臓脂肪組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。マウス脂肪組織は、右精巣周囲脂肪を採取した。脂肪組織における *adipoq* 及び *pparg* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18SrRNA* 発現量を用いて補正した。

A: *Adipoq* 遺伝子発現量

B: *pparg* 遺伝子発現量

*p<0.05, ***p<0.001

内臓脂肪の蓄積の結果から、リバウンド群においては HFD 群と比較すると脂肪の蓄積を確認した。そこで、リバウンド群の脂肪組織における脂肪の蓄積が、脂質合成の増加によるものなのかを検討するために脂質合成関連遺伝子の発現量を Real-time PCR を用いて検討した。

Fatty acid synthase (encoded by *fasn*)は *de novo* の脂質合成遺伝子であり、*de novo* の脂肪酸合成の主要な酵素である⁶¹。 *Fasn* 遺伝子発現においては、RD

群、HFD 群およびリバウンド群の 3 群間で有意な差は確認できなかった (Fig 4.12.A)。

さらに、CD36 (encoded by *cd36*)は長鎖脂肪酸の受容体として知られ、細胞内への脂肪酸取り込みを亢進する⁶²。*Cd36* 遺伝子発現は RD 群、HFD 群およびリバウンド群の 3 群間で有意な差は確認できなかった (Fig 4.12.B)。

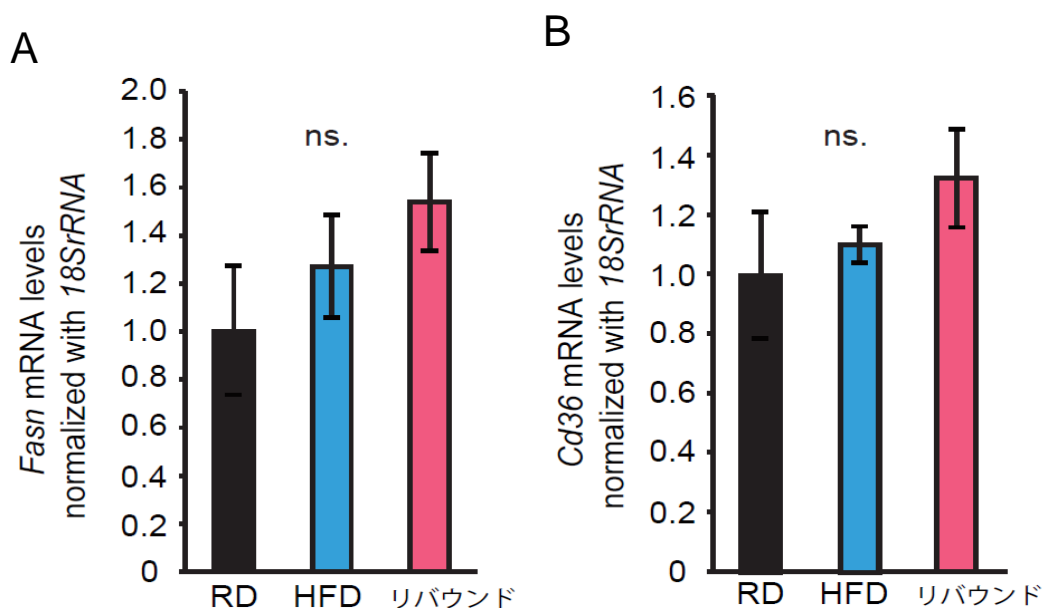


Figure 4.12.リバウンド実験後のマウス脂肪組織における *fasn* 及び *cd36* 遺伝子発現量

実験終了後、マウス内臓脂肪組織を 12 時間の絶食を負荷し、麻酔下で頸椎脱臼を行い採取した。マウス脂肪組織は、右精巣周囲脂肪を採取した。脂肪組織における *fasn* 及び *cd36* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである *18S rRNA* 発現量を用いて補正した。

A: *Adipoq* 遺伝子発現量

B: *pparg* 遺伝子発現量

ns : not significant.

4-4 考察

リバウンドが悪なのか善なのかの議論は未だ解決されていない。そこで本研究では、リバウンドマウスモデルを用いて単回のリバウンドが生体に及ぼす影響を検討した。

単回のリバウンドを負荷したリバウンド群のマウスでは、血中 **LECT2** 濃度及び *Lect2* 肝遺伝子発現は **HFD** 群と比較して有意に低値であった。この結果は、**LECT2** の産生において一度痩せたことによるエピジェネティックな変化が残っていることを示唆する。

リバウンド群では **HFD** 群と比較すると血中グルコース濃度に変化はなかった一方で、血中インスリン濃度はリバウンド群で低下傾向であった。血中インスリン濃度の低下はインスリン抵抗性の改善を示している。この結果は、単回のリバウンドはインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。また、**LECT2** は骨格筋特異的にインスリン抵抗性を誘導することが知られている²⁷。さらにリバウンド群では **HFD** 群と比較して **LECT2** 産生が減弱していた。この結果は、リバウンドは血中 **LECT2** 濃度の低下を導き、この血中 **LECT2** 濃度の低下によって骨格筋インスリン抵抗性が改善され、血中インスリン濃度が低下したと考えられる。

リバウンド群では **HFD** 群と比較すると肝臓中性脂肪含有量は有意に低下し、さらに脂肪合成遺伝子 *srebf1* 遺伝子発現も低下傾向であり、*pparg* 遺伝子発現は有意に低下した。この結果は、ダイエットによる脂肪肝改善効果がリバウンド後でも残っている可能性を示唆する。ヒトを対象とした研究においても、カロリー制限によるダイエットの後、リバウンドしたヒトではダイエットしたときの脂肪肝改善効果はリバウンド後でも残っていることが報告されている⁴⁷。

リバウンド群では **HFD** 群と比較すると内臓脂肪重量は増加し、脂肪細胞の肥大化が見られた。その一方で、リバウンド群および **HFD** 群では、脂肪組織における脂質合成関連遺伝子やアディポネクチン遺伝子の発現には差が見られなかった。この結果は、単回のリバウンドは内臓脂肪の蓄積を増悪させ、脂肪細胞を肥大化させる可能性を示唆する。

単回のリバウンドは、肝臓において脂肪蓄積を抑制し、一方で、脂肪細胞において脂肪蓄積が亢進した。肝臓に蓄積した脂肪の由来は研究されており、肝臓に蓄積した脂肪の 15%は食餌由来とされ、25%は肝臓における *de novo* の脂肪合成によるもの、残りの 60%は血中に存在する NEFA によるものであると報告されている⁶³。NEFA は脂肪組織で中性脂肪が分解した際に分泌される。今回の実験では、リバウンド群は **HFD** 群と比較して 1 日あたりの摂取カロリーが増大している。このことから食餌由来の脂肪蓄積は亢進していると考えられる。

その一方で、リバウンド群では *de novo* の脂肪合成に関連する *srebf1* や *pparg* の遺伝子発現が HFD 群と比較すると、低値である。このことから、リバウンド群では *de novo* の脂肪合成は低下していると考えられる。脂肪組織においては、*de novo* の脂肪酸合成遺伝子 *fasn* はおよび脂肪酸取り込み受容体 *cd36* の遺伝子発現はリバウンド群と HFD 群で差はなかった。このことから、リバウンド群と HFD 群において脂肪組織では脂肪合成に差はないと考えられる。これらの結果は、リバウンド群では HFD 群と比較してリポライシスが低下している可能性を示唆する。インスリンは脂肪組織においてリポライシスを抑制することが知られている⁶⁴。リバウンド群では HFD 群と比較してインスリン抵抗性が改善されているので、リバウンド群ではインスリンによるリポライシスの抑制が強くなり、その結果、血中へ分泌される NEFA が抑制され、内臓脂肪組織が増大し、肝臓においては NEFA の取り込み量が減少し、肝臓の脂肪蓄積が低下した可能性が考えられる。

本実験結果はリバウンドすると、内臓脂肪重量こそ増えるものの、インスリン抵抗性の改善並びに脂肪肝が改善した。しかしながらこの結果は 1 回だけのダイエットとリバウンドによる影響を見た結果であり、既報ではダイエットとリバウンドを複数回繰り返すと糖代謝や脂肪肝が亢進するといった報告もある³⁹。リバウンドの効果を明らかにするにはさらなる検討が必要である。

第五章 血中 LECT2 濃度と肥満関連パラメータとの相関関係

5-1 序章

これまでの研究で LECT2 は生体内の様々なパラメータと特に肥満やインスリン抵抗性パラメータと強く相関することが知られている。ヒトにおいて、血中 LECT2 濃度は、肥満の指標である BMI、内臓脂肪蓄積量を反映する腹囲、さらに加えてインスリン抵抗性の指標である HOMA IR や HbA1c と正相関する²⁷。しかしながら、血中 LECT2 濃度は肥満パラメータと相関する一方で、血中 LECT2 濃度がどの臓器の脂肪蓄積を反映しているかは明らかにされていなかった。

本実験では、RD 群、HFD 群およびリバウンド群の 3 つの背景をもつマウスにおいて、血中 LECT2 濃度と相関する肥満や脂肪肝パラメータを探索した。

5-2 実験方法

3-2項で用いたマウスの実験終了時の血中 LECT2 濃度と体重、血中インスリン濃度、血中グルコース濃度、肝臓中性脂肪含有量および内臓脂肪量との相関関係を検定した。サンプルはすべて 12 時間の絶食状態のものを使用した。血中 LECT2 濃度との相関検定には、SPSS を用い、Spearman's correlation coefficient 検定を行い、 $p < 0.05$ である場合を有意とした。

5-3 結果

RD 群、HFD 群およびリバウンド群の 3 つの背景をもつマウスにおいて、血中 LECT2 濃度と相関する肥満や脂肪肝パラメータを探索した。

血中 LECT2 濃度と体重において強い正相関を示すことを確認した (Fig 5.A)。血中 LECT2 濃度と血中インスリン濃度において強い正相関を示すことを確認した (Fig 5.B)。血中 LECT2 濃度と血中グルコース濃度において正相関を示すことを確認した (Fig 5.C)。血中 LECT2 濃度と肝臓中性脂肪含有量において強い正相関を示すことを確認した (Fig 5.D)。

一方で、血中 LECT2 濃度と内臓脂肪重量において相関を示さなかった (Fig 5.E)。

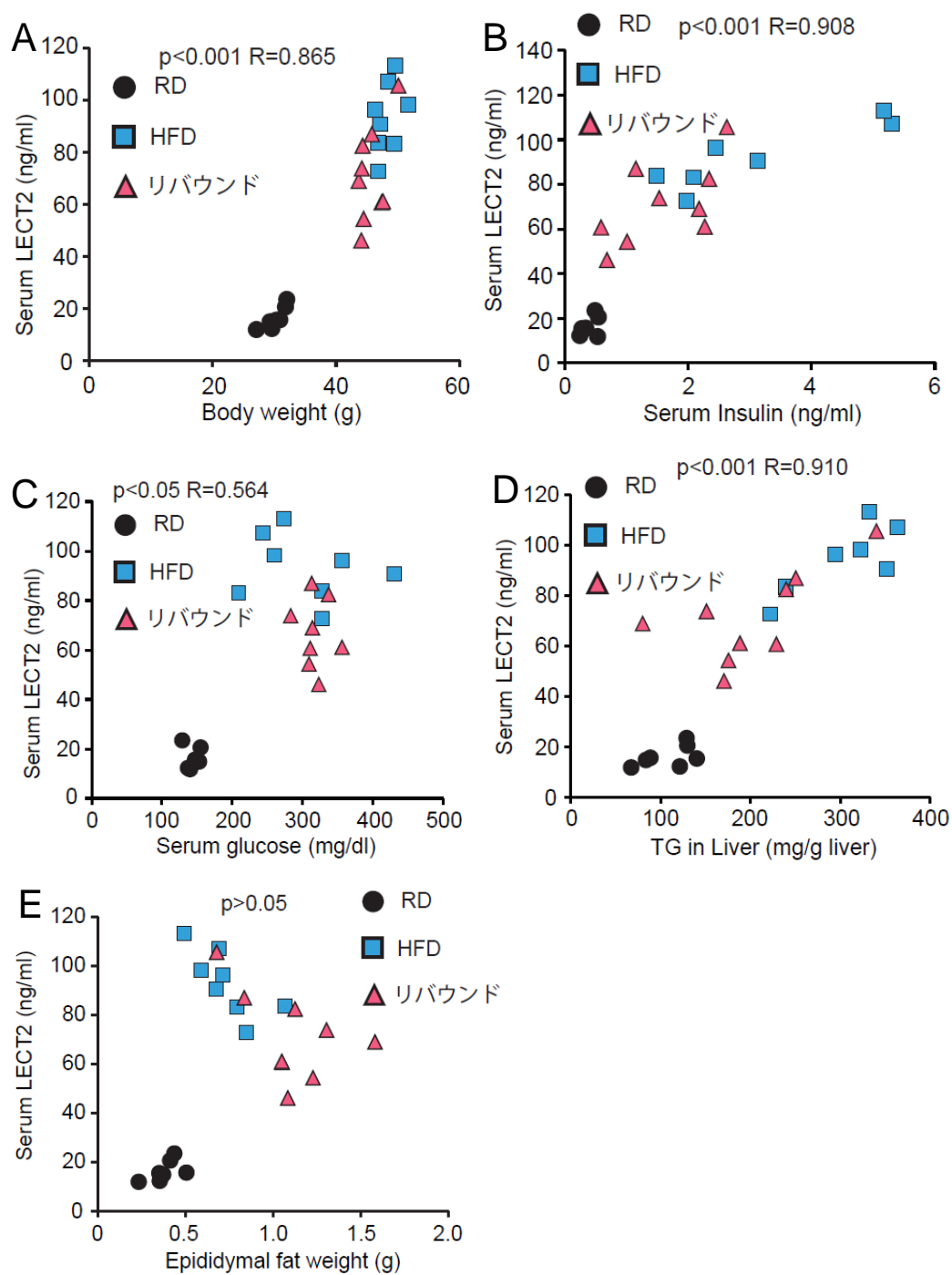


Figure 5. リバウンド実験後の血中 LECT2 濃度と肥満パラメータの相関

実験終了後の血中 LECT2 濃度と肥満パラメータの相関は SPSS を使い、Spearman's correlation coefficient 検定を行い、 $p < 0.05$ である場合を有意とした。

A: 血中 LECT2 濃度と体重の相関 B: 血中 LECT2 濃度と血中インスリン濃度の相関 C: 血中 LECT2 濃度と血中グルコース濃度の相関 D: 血中 LECT2 濃度と肝臓内中性脂肪含量との相関 E: 血中 LECT2 濃度と内臓脂肪重量との相関

5-4 考察

本実験では、RD 群、HFD 群およびリバウンド群の 3 つの背景をもつマウスにおいて、血中 LECT2 濃度と相関する肥満や脂肪肝パラメータを探索した。

血中 LECT2 濃度は体重、血中インスリン濃度、血中グルコース濃度、肝臓中性脂肪含有量と強い正相関を示した。一方で、血中 LECT2 濃度は内臓脂肪重量と相関を示さなかった。

ヒトにおいて血中 LECT2 濃度は内臓脂肪量を反映する腹囲と正相関を示すことが知られている²⁷。一方で、血中 LECT2 濃度がどの臓器の脂肪蓄積を反映しているかは明らかにされていなかった。本実験結果では、血中 LECT2 濃度は内臓脂肪重量とは相関せずに、肝臓の脂肪蓄積と強く相関した。この結果は、LECT2 は内臓脂肪の蓄積ではなく肝臓における脂肪の蓄積と深く関わっている可能性を示唆する。既報では、ヒトにおいて脂肪肝の指標である γ -GTP と血中 LECT2 濃度が相関する報告もあり⁵³、本実験結果は、血中 LECT2 濃度は脂肪肝の度合いを反映する脂肪肝マーカーである可能性を示唆する。

現在、肝臓脂肪含有量の測定は肝生検や MRI、CT スキャンや腹部エコー検査が用いられている⁶⁵。しかしながらこれらの検査は侵襲的であり、また検査費用が高いなどの問題点も存在する。血中 LECT2 濃度が肝臓脂肪蓄積を反映する脂肪肝マーカーとして応用されるなら、非侵襲的で安価な方法で肝臓脂肪蓄積を評価できる。LECT2 の脂肪肝マーカーとしての応用のためにさらなる臨床研究が期待される。

第六章 LECT2 過剰産生誘導因子の探索

6-1 序章

LECT2 の発現制御についての研究はこれまでに報告されている。2004 年には β カテニンが LECT2 プロモーターに直接結合することで LECT2 の発現を制御していることが報告された³³。さらに、2014 年には生体内でエネルギーセンサーとして働く AMPK が LECT2 の発現を負に制御していることが報告された²⁷。

我々の研究室においてマウス肝がん由来 Hepa1-6 細胞に 5 mM グルコースと 30 mM グルコースを 24 時間処置すると、培養メディウム中の LECT2 濃度は 30 mM のグルコース処置において 2 倍に上昇した。しかしながら、グルコースによる誘導は短時間の処置では見られずに 24 時間の長期処置のみに見られた。さらに、Hepa1-6 細胞に脂肪酸であるパルミチン酸を 0.25 mM で 24 時間処置すると培養メディウム中の LECT2 濃度は 1.2 倍に上昇した。

しかしながら、グルコースや脂肪酸処置の培養肝細胞の実験結果は、マウスの実験結果と比較すると LECT2 上昇が非常に軽微でかつその上昇が誘導されるまでに時間がかかっている。このことから、高脂肪食によって誘導される LECT2 産生上昇には、食餌中の成分以外の誘導因子が存在することが考えられた。

我々の研究室では、ラット肝がん細胞 H4IIEC3 にインスリンを処置することで、*Lect2* 遺伝子発現が抑制されることを報告した。このときインスリンによる *Lect2* 遺伝子発現抑制は低濃度のインスリンでも *Lect2* 遺伝子発現が強く抑制され、かつ短時間のインスリン処置でも *Lect2* 遺伝子発現は抑制された。これらの結果は、*Lect2* 遺伝子発現はインスリンによって負に制御されている可能性を示唆する。

本実験では、インスリンによる *Lect2* 遺伝子発現抑制の詳細なメカニズムを明らかにするため、ヒト LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを作成し、インスリンによる LECT2 プロモーター作用領域を探索した。さらに、インスリンによる *Lect2* 抑制効果が他の細胞でも見られるかをマウス初代培養肝細胞を用いて検討した。

6-2 実験方法

6-2-1 インスリンによる LECT2 転写活性の制御

LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターの作成

LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを 2 種類作成した。

ヒト LECT2 翻訳開始地点から-2350bp までをクローニングし、pGL3-Basic Vector に導入した。作成した LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターはシーケンスで配列が正しいことを確かめた。さらにプロモーター配列には LECT2 転写開始点 4 箇所が含まれていることを確認した。

さらに加えて、上流の-4200bp から-2350bp をクローニングし、転写開始に必要な minP 配列を含む pGL4.23[luc/minP]Vector に導入し、LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを作成した。作成後シーケンスを行い、配列が正しいことを確かめた。

インスリンによる LECT2 転写活性の制御

H4IIEC3 細胞を 24well plate に 7×10^4 /well 播種し、24 時間後 FuGENE6 を用いて細胞に LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを導入した。導入後 48 時間培養し 12 時間の starvation をかけ、インスリンを処置した。インスリンの処置濃度は、10 ng/ml および 5 μ g/ml で行った。処置後細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

6-2-2 マウス初代培養肝細胞を用いたインスリンによる *Lect2* 遺伝子発現制御の検討

マウス初代培養肝細胞は雄性 11 週齢の C57BL/6J マウスから獲得した。初代培養肝細胞をプレートに播種し、24 時間後新しい培地に交換し、24 時間後 16 時間の starvation を行った。Starvation 後 PBS で wash した後にインスリンを 6 時間処置した。処置後、RNA を回収し、*Lect2* 遺伝子発現量を Real-time PCR で測定した。処置培地中に含まれる Dexamethasone や膜透過性 8Bro-cAMP は細胞中の糖新生を誘導する⁶⁶。細胞は cAMP/Dexa 存在下及び非存在下で実験を行い、それぞれ絶食、食後状態をミミックした。cAMP/Dexa 存在下及び非存在下でのインスリンの作用を評価した。

処置培地を以下に示す。

培養培地

- Wiiliam's E medium
- 10%FBS
- 1%p/s
- 1%L-glu
- 100nM Dexamethasone
- 10nM Insulin

starvation 培地

- Wiiliam's E medium

starvation 培地(cAMP/Dexa)

- Wiiliam's E medium
- 100nM Dexamethasone
- 1mM 8Bro-cAMP

処置培地

- Wiiliam's E medium
- 100nM Insulin

処置培地(cAMP/Dexa)

- Wiiliam's E medium
- 100nM Dexamethasone
- 1mM 8Bro-cAMP
- 100nM Insulin

6-3 結果

6-3-1 インスリンによる LECT2 転写活性の制御

本実験では、インスリンによる Lect2 遺伝子発現抑制の詳細なメカニズムを明らかにするため、ヒト LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを作成し、インスリンによる LECT2 プロモーター作用領域を探索した。

LECT2 翻訳開始領域から-2350bp までをクローニングし導入した LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを導入した細胞に 6h インスリンを処置しても、LECT2 プロモーター活性は抑制されなかった。

さらに上流の-2350bp から-4200bp までをクローニングし導入した LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを導入した細胞に 6h インスリンを処置しても、LECT2 プロモーター活性は抑制されなかった。

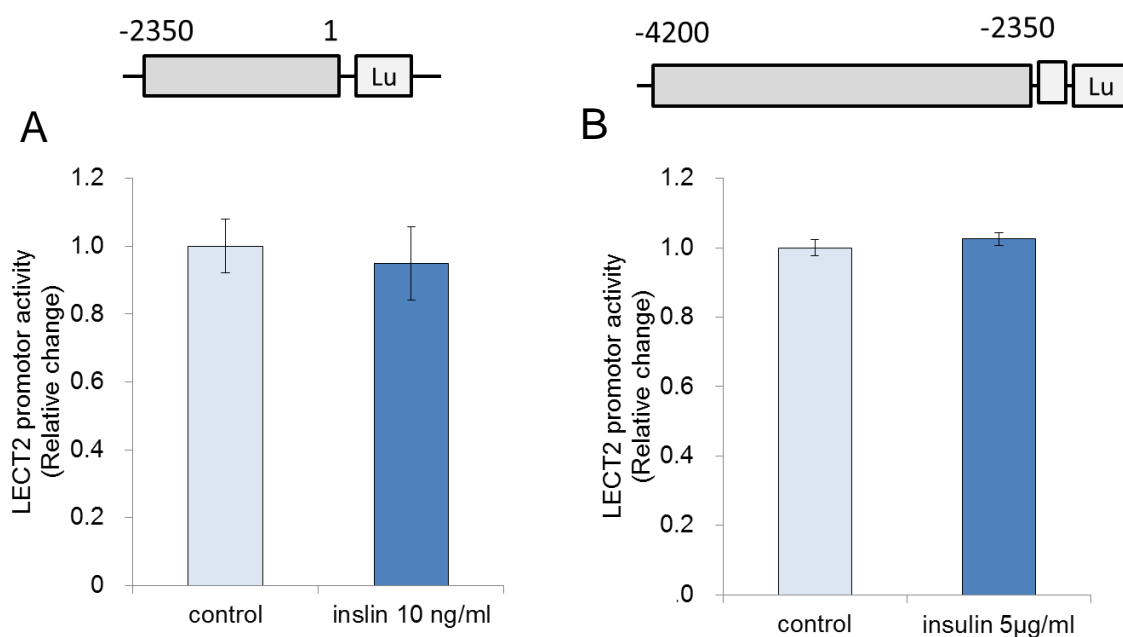


Figure 6.1. インスリン処置による LECT2 プロモーター活性の検討

H4IIEC3 細胞に LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを導入した。導入後 48 時間培養し 12 時間の starvation をかけ、インスリンを 6 時間処置した。インスリンの処置濃度は、10 ng/ml および 5 µg/ml で行った。

A: LECT2 上流の翻訳開始地点から-2350bp をルシフェラーゼベクターに組み込み、10 ng/ml のインスリンを 6 時間処置した時の LECT2 転写活性

B: LECT2 上流の-2350bp から-4200bp をルシフェラーゼベクターに組み込み、5 µg/ml のインスリンを 6 時間処置した時の LECT2 転写活性

6-3-2 マウス初代培養肝細胞を用いたインスリンによる *Lect2* 遺伝子発現制御の検討

LECT2 プロモーターシフエラーゼベクターを用いた実験では、インスリンによる LECT2 プロモーター活性の抑制は見られなかった。そこで、インスリンによる LECT2 抑制効果が H4IIEC3 細胞特異的なものなのかを調べるために、マウス初代培養肝細胞を用いて検討した。

Glucose-6-phosphatase catalytic subunit (encoded by *g6pc*)は糖新生に関わる酵素である。

cAMP 及び Dexamethasone 非存在下では、100 nM のインスリンを 6 時間処置することで、*Lect2* 遺伝子発現は有意に上昇した。またこのとき *G6pc* 遺伝子発現は検出されなかった。

cAMP 及び Dexamethasone 存在下では、100 nM のインスリンを 6 時間処置することで、*G6pc* 遺伝子発現は有意に低下した。またこのとき *Lect2* 遺伝子発現はインスリンを処置しても変化しなかった。

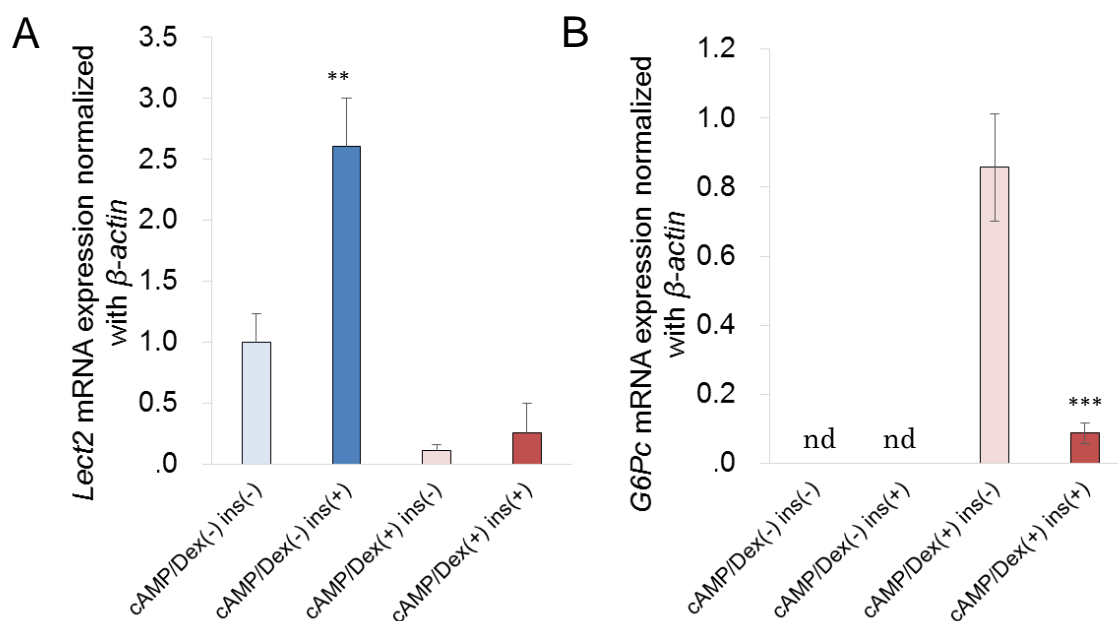


Figure 6.2. 初代培養肝細胞におけるインスリン処置による LECT2 発現制御の検討

マウスから初代培養肝細胞を単離した。16 時間の starvation をかける際に cAMP 1 mM/Dexamethasone 100 nM を前処置し、6 時間 100 nM のインスリンを処置した。*Lect2* 及び *G6pc* 遺伝子発現量を Real-time PCR を用いて定量し、測定値をインターナルコントロールである β -actin 発現量を用いて補正した。

A: *Lect2* 遺伝子発現量

B: *G6pc* 遺伝子発現量

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

6-4 考察

本実験では、インスリンによる *Lect2* 遺伝子発現抑制の詳細なメカニズムを明らかにするため、ヒト *LECT2* プロモータールシフェラーゼベクターを作成し、インスリンによる *LECT2* プロモーター作用領域を探索した。さらに、インスリンによる *LECT2* 抑制効果をマウス初代培養肝細胞を用いて検討した。

ヒト *LECT2* プロモータールシフェラーベクターを導入した実験では、インスリンの作用領域は翻訳開始点から上流-4200bp の領域で確認できなかった。この結果は、インスリンは *LECT2* の転写活性に影響を与えない、またはインスリンの作用領域が-4200bp のさらに上流にあることを示唆する。

H4IIEC3 細胞において、インスリンは *Lect2* 遺伝子発現を抑制する一方で、初代培養肝細胞を用いた実験において、食後状態をミミックした状態では、インスリンによって *Lect2* 遺伝子発現は上昇した。マウスを用いた実験においても、食後や肥満状態など血中インスリン濃度が高値の時に、血中 *LECT2* 濃度は上昇する。この結果は、食後状態時においてインスリンは *LECT2* の産生を亢進することを示唆する。H4IIEC3 細胞で見られた *Lect2* 遺伝子発現の現象は細胞種の違いによる影響だと考えられる。

肥満時に *LECT2* 産生が誘導される詳細なメカニズムは未だ解明されていない。しかしながら、培養肝細胞を用いて、餌の成分であるグルコースや脂肪酸を処置した実験ではその発現上昇率は低く、また非常に遅いことが分かっている。これらの結果は、肥満による *LECT2* 産生増大には、餌の成分ではなく、血中に存在するインスリンを初めとした他臓器からのホルモンまたは神経系の制御によって制御されている可能性を示唆する。肥満時における *LECT2* 産生増大メカニズムの解明はさらなる研究が必要である。

第七章 総括

本実験では食種変更により、急激な体重変化を起こすリバウンドマウスモデルを作成し、食種変化時における体重の変化および血中 **LECT2** 濃度変化を検討した。さらに、リバウンドによる生体への影響を評価した。

第三章では、食種変更時の体重変化と血中 **LECT2** 濃度変化を検討し以下の知見が得られた。

①マウスの食餌を **HFD** から **RD** に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに減少し切り替え後 30 日で **RD** 群と同等まで低下した。一方で、血中 **LECT2** 濃度は切り替え後急激に減少し、10 日目には **RD** 群と同等まで低下した。

②食餌を 1 ヶ月間の **RD** から **HFD** に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに上昇し切り替え後 40 日で **HFD** 群と同等まで上昇した。一方で、血中 **LECT2** 濃度は切り替え後急激に上昇し、切り替え後 4 日目には **RD** 群比較すると約 1.6 倍まで上昇した。

この結果は、血中 **LECT2** 濃度は食種変更を鋭敏に感知し、体重よりも早期にダイナミックに動くヘパトカインであることを示唆し、**LECT2** は過栄養状態時の栄養状態を反映する過栄養マーカーとして応用出来る可能性を示唆する。

第四章では、単回のリバウンドが生体に及ぼす影響を検討し以下の知見が得られた。

①リバウンド群では、**HFD** 群と比較して血中 **LECT2** 濃度が減少し、**Lect2** 遺伝子発現が減弱した。

②リバウンド群では、**HFD** 群と比較して肝臓における中性脂肪の蓄積が改善され、脂質合成遺伝子の発現量も減少した。

③リバウンド群では、**HFD** 群と比較して血中インスリン値が低下傾向であった。

④リバウンド群では、**HFD** 群と比較して、脂肪組織重量の増加及び脂肪細胞の肥大化を確認した。

この結果は、単回のリバウンドを負荷することですと肥満の状態よりは、脂肪組織の蓄積は増悪するが、脂肪肝の改善やインスリン抵抗性の改善することを示唆する。

第五章では血中 LECT2 濃度と各肥満パラメータとの相関を検討し、血中 LECT2 濃度と関連するパラメータの探索を行った。

- ①血中 LECT2 濃度は体重と強い正相関を示した。
- ②血中 LECT2 濃度は血中インスリン濃度と強い正相関を示した。
- ③血中 LECT2 濃度は血中グルコース濃度と正相関を示した。
- ④血中 LECT2 濃度は肝臓中性脂肪含有量と強い正相関を示した。
- ⑤血中 LECT2 濃度は内臓脂肪重量とは相関を示さなかった。

この結果は、血中 LECT2 濃度は肝臓における脂肪蓄積量を反映するヘパトカインであることを示唆し、LECT2 は脂肪肝の程度を反映する脂肪肝マーカーとして応用出来る可能性を示唆する。

第六章では、インスリンによる LECT2 抑制作用の詳細なメカニズムを明らかにするために、LECT2 プロモーター領域をベクターに組み込んだ LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを作成し、転写レベルでのインスリンによる LECT2 抑制作用を検討した。さらに、インスリンによる LECT2 抑制作用が H4IIEC3 細胞特異的なのかを評価するために、マウスから初代培養肝細胞を獲得し、初代培養肝細胞でのインスリンによる LECT2 発現への影響を検討し以下の知見が得られた。

①LECT2 プロモーターの上流-4200 までを導入した、LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを用いた検討では、インスリンの作用領域はなく、インスリンによる LECT2 転写活性抑制作用は確認されなかった。

②食後状態をミミックした初代培養肝細胞においてインスリンは *Lect2* 遺伝子発現を上昇させた。

これらの結果はインスリンの作用領域が-4200bp のさらに上流にあることを示唆する。食後状態時においてインスリンは LECT2 の産生を亢進することを示唆する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導、御助言を賜りました金沢大学大学院 医学系研究科 内分泌・代謝内科学分野

篁 俊成 教授、

御簾 博文 准教授

に心より御礼申し上げます。

最後に、温かいご指導、御助言、ご協力頂きました研究室の皆様、互いに切磋琢磨した同期学友に深く感謝致します。

参考文献

1. 平成26年国民健康 ・ 栄養調査結果 厚生労働省
2. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
3. Rahmouni, K., Correia, M. L. G., Haynes, W. G. & Mark, A. L. Obesity-associated hypertension: New insights into mechanisms. *Hypertension* **45**, 9–14 (2005).
4. Klop, B., Elte, J. W. F. & Cabezas, M. C. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **5**, 1218–1240 (2013).
5. The Global BMI Mortality Collaboration. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* **388**, 776–786 (2016).
6. DeFronzo, R. A. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**, 667–687 (1988).
7. Mokdad, A., Ford, E. & Bowman, B. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama* **289**, 76–9 (2003).
8. Yamashita, S. *et al.* Insulin Resistance and Body Fat Distribution. *Diabetes* **19**, (1995).
9. Hotamisligil, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* **245**, 621–625 (1999).
10. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 3015–3025 (2006).
11. Yang, Q. *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356–362 (2005).
12. Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288–95 (2002).
13. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
14. Antuna-Puente, B., Fève, B., Fellahi, S. & Bastard, J. P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* **34**, 2–11 (2008).
15. Kohjima, M. *et al.* SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK

- signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* **21**, 507–511 (2008).
16. Misu, H. *et al.* Article A Liver-Derived Secretory Protein ,Selenoprotein P, Causes Insulin Resistance. *Cell Metab.* **12**, 483–495 (2010).
 17. Ishikura, K. *et al.* Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia* **57**, 1968–1976 (2014).
 18. Stefan, N. & Häring, H.-U. The role of hepatokines in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 144–52 (2013).
 19. Yamagoe, S. *et al.* Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2. *Immunol. Lett.* **52**, 9–13 (1996).
 20. Yamagoe, S., Mizuno, S. & Suzuki, K. Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 105–113 (1998).
 21. Yamagoe, S. *et al.* Expression of a Neutrophil Chemotactic Protein LECT2 in Human Hepatocytes Revealed by Immunochemical Studies Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies to a Recombinant LECT2. **120**, 116–120 (1997).
 22. Benson, M. D., James, S., Scott, K., Liepnieks, J. J. & Kluve-Beckerman, B. Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney Int.* **74**, 218–222 (2008).
 23. Pheesse, T. J. *et al.* Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6094–103 (2008).
 24. Ong, H. T. *et al.* The tumor suppressor function of LECT2 in human hepatocellular carcinoma makes it a potential therapeutic target. *Cancer Gene Ther.* **18**, 399–406 (2011).
 25. Lu, X.-J. *et al.* LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor. *J. Exp. Med.* **210**, 5–13 (2013).
 26. Chen, C. K. *et al.* Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 antagonizes MET receptor activation to suppress hepatocellular carcinoma vascular invasion by protein tyrosine phosphatase 1B recruitment. *Hepatology* **59**, 974–985 (2014).
 27. Lan, F. *et al.* LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to

- skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* **63**, 1649–1664 (2014).
28. Misu, H. *et al.* Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**, 268–77 (2007).
 29. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25 (2005).
 30. Hardie, D. G., Ross, F. a. & Hawley, S. a. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–262 (2012).
 31. Takayama, H. *et al.* Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/ FoxO3a Pathway. **289**, 335–345 (2014).
 32. Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M. & Cacicedo, J. M. Science in medicine AMPK , insulin resistance , and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **123**, 2764–2772 (2013).
 33. Ovejero, C. *et al.* Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of β -catenin in the liver. *Hepatology* **40**, 167–176 (2004).
 34. Cantó, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–60 (2009).
 35. Votruba, S. B., Horvitz, M. A. & Schoeller, D. A. The role of exercise in the treatment of obesity. *Nutrition* **16**, 179–188 (2000).
 36. Ahead, L. Obesity management for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **39**, S47–S51 (2016).
 37. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* **142**, 1592–1609 (2012).
 38. Dulloo, A. G. & Montani, J. P. Pathways from dieting to weight regain, to obesity and to the metabolic syndrome: An overview. *Obes. Rev.* **16**, 1–6 (2015).
 39. Dankel, S. N. *et al.* Weight cycling promotes fat gain and altered clock gene expression in adipose tissue in C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E210-24 (2014).

40. Barbosa-da-silva, S., Fraulob-aquino, J. C., Lopes, J. R., Mandarim-de-lacerda, C. A. & Aguila, M. B. Weight Cycling Enhances Adipose Tissue Inflammatory Responses in Male Mice. *Plos One*, **7**, (2012).
41. Barbosa-da-silva, S., Silva, N. C., Aguila, M. B. & Mandarim-de-lacerda, C. A. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepat Res.* **44**, 450–459 (2014). doi:10.1111/hepr.12138
42. Edward O. List et al. The effect of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice. *Int, J, Obes.* **37**, 1088-1094 (2013).
43. Lahmann, P. H., Williams, G. M., Najman, J. M. & Mamun, A. A. Mother – adult offspring resemblance in dietary intake : a community-based cohort study in Australia 1 – 3. *Am J Clin Nutr.* **105**, 185-193(2017). doi:10.3945/ajcn.116.137539.
44. Bosy-Westphal, A., Kahlhöfer, J., Lagerpusch, M., Skurk, T. & Müller, M. J. Deep body composition phenotyping during weight cycling: Relevance to metabolic efficiency and metabolic risk. *Obes. Rev.* **16**, 36–44 (2015).
45. Yatsuya, H. *et al.* Association between weight fluctuation and fasting insulin concentration in Japanese men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27**, 478–83 (2003).
46. Neamat-Allah, J. *et al.* Weight cycling and the risk of type 2 diabetes in the EPIC-Germany cohort. *Diabetologia* **58**, 2718–2725 (2015).
47. Haufe, S. *et al.* Long-lasting improvements in liver fat and metabolism despite body weight regain after dietary weight loss. *Diabetes Care* **36**, 3786–3792 (2013).
48. Montani, J. P., Schutz, Y. & Dulloo, A. G. Dieting and weight cycling as risk factors for cardiometabolic diseases: Who is really at risk? *Obes. Rev.* **16**, 7–18 (2015).
49. Young, V. TRANSTHYRETIN (PREALBUMIN) IN HEALTH AND DISEASE : Nutritional Implications. *Annu. Rev.Nutr.* **14**, 495–533 (1994).
50. Beck, F. K. & Rosenthal, T. C. Prealbumin: A marker for nutritional evaluation. *Am. Fam. Physician* **65**, 1575–1578 (2002).
51. Yamamoto, K., Kitagawa, N. & Takamasu, T. Standard values of rapid turnover proteins and zinc in Japanese children. *Asia Pac. J. Clin.*

- Nutr.* **24**, 504–508 (2015).
52. Ueno, T. *et al.* Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J. Hepatol.* **27**, 103–107 (1997).
 53. Okumura, A. *et al.* Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *Biosci. Trends* **7**, 276–283 (2013).
 54. Jeon, T. Il & Osborne, T. F. SREBPs: Metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 65–72 (2012).
 55. Al Sharif, M., Alov, P., Vitcheva, V., Pajeva, I. & Tsakovska, I. Modes-of-Action Related to Repeated Dose Toxicity: Tissue-Specific Biological Roles of PPAR-gamma Ligand-Dependent Dysregulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PPAR Res.* **2014**, (2014).
 56. Schreurs, M., Kuipers, F. & Van Der Leij, F. R. Regulatory enzymes of mitochondrial β -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes. Rev.* **11**, 380–388 (2010).
 57. Korkeila, M., Rissanen, A., Kaprio, J., Sørensen, T. I. A. & Koskenvuo, M. Weight-loss attempts and risk of major weight gain: A prospective study in Finnish adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 965–975 (1999).
 58. Kubota, N. *et al.* PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* **4**, 597–609 (1999).
 59. Kubota, N. *et al.* Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 8748–8755 (2006).
 60. N, M., M, T., T, F. & Others. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin. *Diabetes* **50**, 2094–2099 (2001).
 61. Jensen-Urstad, A. P. L. & Semenkovich, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 747–753 (2012).
 62. Febbraio, M. *et al.* A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism *. *J. Biol. Chem.* **274**, 19055–19062 (1999).
 63. Tamura, S. & Shimomura, I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1139–1142 (1997).
 64. Choi, S. M. *et al.* Insulin regulates adipocyte lipolysis via an

- Akt-independent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5009–20 (2010).
65. Son, J. *et al.* Hepatic Steatosis: Assessment with Acoustic Structure Quantification of US Imaging. *Radiology* **.278**, 257-264 (2015).
 66. Yoon, J. C. *et al.* Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131–138 (2001).